



Aus der Klinik für Neurologie
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang H. Oertel
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Wirkungen der natürlich vorkommenden α -Synuclein- Autoantikörper auf toxische α -Synuclein-Fragmente

Inaugural-Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Monika Rabenstein
aus Nürnberg

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 17.07.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. R. Dodel

Korreferent: Herr PD Dr. H.-A. Braun

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung..... | 4 |
| 1.1 Parkinson-Syndrome | 4 |
| 1.1.1 Parkinsonismus..... | 4 |
| 1.1.2 Das idiopathische Parkinson-Syndrom..... | 5 |
| 1.1.3 Familiäre Parkinson-Syndrome | 7 |
| 1.1.4 Toxininduziertes Parkinson-Syndrom..... | 8 |
| 1.1.5 Neurophysiologische und -pathologische Grundlagen..... | 9 |
| 1.1.6 Braak-Staging | 11 |
| 1.1.7 Selektive Vulnerabilität dopaminerger SNpc Neurone | 14 |
| 1.1.8 Pathogenese des IPS | 15 |
| 1.2 α-Synuclein | 15 |
| 1.2.1 Vorkommen..... | 15 |
| 1.2.2 Struktur | 16 |
| 1.2.3 Funktion..... | 19 |
| 1.2.4 Konformation und Aggregation | 21 |
| 1.2.5 Toxizität | 23 |
| 1.2.6 Bedeutung für familiäre Parkinson-Syndrome und IPS | 24 |
| 1.2.7 Synucleinopathien..... | 25 |
| 1.3 Antikörper und Immunisierung im IPS | 25 |
| 1.3.1 IVIG..... | 26 |
| 1.3.2 Natürlich vorkommende Autoantikörper | 27 |
| 1.3.3 Immunisierungsansätze..... | 29 |
| 1.4 Mikroglia..... | 30 |
| 1.4.1 Vorkommen und Funktion..... | 30 |
| 1.4.2 Zytokine: TNF α und IL-6..... | 31 |
| 1.4.3 Mikroglia im IPS | 31 |
| 1.4.4 Neuroinflammation | 32 |
| 1.5 Ziele der Arbeit | 33 |
| 2. Material und Methoden | 36 |
| 2.1 Geräte..... | 36 |
| 2.2 Chemikalien | 37 |
| 2.3 Verbrauchsmaterialien | 39 |
| 2.4 Zellkulturmaterialien | 39 |
| 2.5 Puffer | 40 |
| 2.6 Antikörper..... | 40 |

| | | |
|--------|---|-----------|
| 2.7 | α-Synuclein und α-Synuclein-Fragmente | 41 |
| 3. | Methoden | 42 |
| 3.1 | Aufreinigung der natürlich vorkommenden α-Syn-Autoantikörper | 42 |
| 3.1.1 | α -Synuclein-Affinitätssäule..... | 42 |
| 3.1.2 | Aufreinigung der α -Synuclein Autoantikörper..... | 43 |
| 3.2 | Rekombinantes α-Synuclein und α-Synuclein-Fragmente..... | 44 |
| 3.2.1 | Lyophilisierte Proteine lösen | 44 |
| 3.2.2 | Lösungen für ELISA und Dot Blot..... | 45 |
| 3.2.3 | Lösungen für die Zellkultur ansetzen..... | 45 |
| 3.3 | Gel-Electrophorese und Western Blot..... | 46 |
| 3.3.1 | SDS-PAGE | 46 |
| 3.3.2 | Western Blot | 48 |
| 3.4 | Proteinnachweis auf SDS-Gelen | 49 |
| 3.4.1 | Coomassie-Färbung | 49 |
| 3.4.2 | Silberfärbung | 49 |
| 3.5 | Immunpräzipitation..... | 50 |
| 3.6 | Epitope Mapping Säulen | 51 |
| 3.6.1 | CarboLink™ Säule..... | 51 |
| 3.6.2 | Sepharosesäule | 53 |
| 3.7 | ELISA..... | 55 |
| 3.7.1 | α -Synuclein-ELISA | 55 |
| 3.7.2 | Zytokin-ELISA | 56 |
| 3.8 | Zellkultur | 57 |
| 3.8.1 | Präparation der Mikroglia..... | 57 |
| 3.8.2 | Präparation der neuronalen Zellen | 58 |
| 3.9 | Zytotoxizitäts-Assays | 58 |
| 3.9.1 | LDH-Assay..... | 58 |
| 3.9.2 | MTT-Assay | 59 |
| 3.10 | Dot Blot | 59 |
| 3.11 | Statistische Analyse | 60 |
| 4. | Ergebnisse..... | 61 |
| 4.1 | Autoantikörperaufreinigung und Bindungsüberprüfung..... | 61 |
| 4.1.1 | Affinitätsaufreinigung der nAK α -Syn | 61 |
| 4.1.2 | Nachweis der Bindung der nAK α -Syn an α -Synuclein | 63 |
| 4.2 | Epitope Mapping..... | 66 |
| 4.2.1. | CarboLink™ -Säule..... | 66 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.2.2 | Sepharose-Säule..... | 70 |
| 4.3 | α-Syn-Fragmente | 72 |
| 4.3.1 | Dot Blot..... | 75 |
| 4.3.2 | Bindungs-ELISA..... | 83 |
| 4.3.3 | CD-Spektrometrie | 90 |
| 4.4 | Zellkultur | 93 |
| 4.4.1 | Primäre murine kortikale Neurone | 93 |
| 4.4.2 | Primäre murine Mikroglia | 102 |
| 4.5 | Zytokin-ELISA..... | 106 |
| 4.5.1 | Fragment-induzierte Zytokinausschüttung..... | 106 |
| 4.5.2 | Zytokin-ELISAs mit nAK α -Syn..... | 108 |
| 4.6 | Zusammenfassung Ergebnisse..... | 111 |
| 5. | Diskussion | 112 |
| 5.1 | Probleme bei der Etablierung des Epitope Mappings..... | 113 |
| 5.2 | α -Synuclein-Fragmente: Aggregation und Toxizität..... | 113 |
| 5.3 | Bedeutung natürlich vorkommender α -Syn-Autoantikörper..... | 115 |
| 5.4 | Inhibition der Toxizität auf primären Neuronen..... | 117 |
| 5.5 | Neuroinflammation | 118 |
| 5.6 | Ausblick..... | 126 |
| 6. | Zusammenfassung | 128 |
| 7. | Summary..... | 130 |
| 8. | Literaturverzeichnis..... | 132 |
| 9. | Abkürzungsverzeichnis..... | 143 |
| 10. | Abbildungsverzeichnis..... | 145 |
| 11. | Tabellenverzeichnis | 147 |
| 12. | Verzeichnis akademischer Lehrer..... | 148 |
| 13. | Danksagung | 149 |

1. Einleitung

1.1 Parkinson-Syndrome

1.1.1 Parkinsonismus

Eine Vielzahl von ätiologisch unterschiedlichen Erkrankungen manifestieren sich klinisch durch den Symptomkomplex *Parkinsonismus*. Als Parkinsonismus (PS) bezeichnet man das Auftreten von Bradykinese in Kombination mit mindestens einem der drei Kardinalsymptome Rigor, Ruhetremor oder posturaler Instabilität (40).

Bradykinese äußert sich durch die Verlangsamung der Initiierung und Durchführung willkürlicher Bewegungen, insbesondere spontaner Bewegungen. Ein maskenhaftes Gesicht, Sialorrhö und das reduzierte Mitschwingen der Arme beim Gehen sind charakteristische klinische Zeichen hierfür. Muskulärer *Rigor* lässt sich unter anderem in der körperlichen Untersuchung durch das sogenannte Zahnradphänomen während passiver Flexions-Extensionsbewegungen feststellen. Des Weiteren finden sich Mikrografie, ein kleinschrittiges Gangbild und eine verminderte Geschicklichkeit. *Tremor*, vorwiegend als Ruhetremor mit einer Frequenz von 4-6 Hz auftretend, ist etwa bei 60-70% der IPS Patienten zu beobachten (102).

Pathophysiologisch liegt eine Dysfunktion der motorischen Basalganglienschleifen vor, die durch mangelnde Verfügbarkeit des Neurotransmitters Dopamin im Striatum entsteht. Dafür ursächlich ist entweder ein präsynaptisches Defizit an striatalem Dopamin, die reduzierte Verfügbarkeit der striatalen postsynaptischen Dopaminrezeptoren oder eine Kombination aus beidem. Je nach Ätiologie des Parkinsonismus können gleichzeitig noch andere bedeutende pathophysiologische Veränderungen bestehen, die dann weitere begleitende Symptome nach sich ziehen (133).

Man kann dem Symptom Parkinsonismus vier Hauptursachen-Gruppen zuordnen: 1) das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS), 2) genetisch bedingte familiäre Formen, 3) symptomatische Formen meist medikamentöser, infektiöser, vaskulärer oder toxischer Genese sowie 4) atypische Parkinson-Syndrome, bei denen zusätzlich noch weitere Symptome vorliegen (zur aktuellen Klassifikation siehe Tab. 1.1).

Tab. 1.1 Klassifikation der Parkinson-Syndrome

| | |
|----|--|
| 1. | Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS, Parkinson-Krankheit, ca. 75% aller PS) wird hinsichtlich der klinischen Symptome in folgende Verlaufsformen eingeteilt: <ul style="list-style-type: none"> • Akinetisch-rigider Typ • Äquivalenz-Typ • Tremordominanz-Typ • Monosymptomatischer Ruhetremor (seltene Variante) • Demenz vom Lewy-Körper-Typ |
| 2. | Familiäre Formen des Parkinson-Syndroms |
| 3. | Symptomatische (sekundäre) Parkinson-Syndrome und häufigere Differenzialdiagnosen : <ul style="list-style-type: none"> • Vaskulär (subkortikale vaskuläre Enzephalopathie) • Normaldruckhydrozephalus • Medikamenteninduziert • Tumorbedingt • Posttraumatisch • Toxininduziert (z. B. Kohlenmonoxid, Mangan) • Entzündlich (AIDS-Enzephalopathie oder seltene Enzephalitiden) • Metabolisch (z. B. Morbus Wilson, Hypoparathyreoidismus) • Depression • Essenzieller Tremor |
| 4. | Parkinson-Syndrome im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen (atypische Parkinson-Syndrome): <ul style="list-style-type: none"> • Multisystematrophie (MSA): Parkinson-Typ (MSA-P) oder zerebellärer Typ (MSA-C) • Progressive supranukleäre Blickparese (PSP) • Kortikobasale Degeneration (CBD) • Spinozerebelläre Atrophien (einige Subtypen) • Demenz vom Lewy-Körper-Typ (DLK) |

Text abgeändert nach (40).

1.1.2 Das idiopathische Parkinson-Syndrom

Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS) ist in 75% der Fälle Ursache eines Parkinsonismus. Es ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Der Erkrankungsbeginn liegt meist zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr. Betroffen sind prozentual mehr Männer als Frauen. Diese chronische Erkrankung verläuft über Jahre hinweg langsam progredient. Bei der über 65-Jährigen Bevölkerung liegt eine Prävalenz von 1.800/100.000 vor (40). Durch den mit der fortschreitenden Behinderung einhergehenden hohen Therapie- und Pflegeaufwand entsteht zudem eine erhebliche sozioökonomische Belastung, die jährlichen Kosten in Deutschland pro Patient und Jahr werden auf 20.095 € geschätzt (132).

Erstmals beschrieben wurden die Symptome dieser Erkrankung 1817 vom

Londoner Arzt *James Parkinson* in dem Buch „An Essay On The Shaking Palsy“: Er beschrieb *"Involuntary tremulous motion, with lessened voluntary power, in parts, not in action, and even supported."* und *"A propensity to bend the trunk forwards, and to pass from a walking to a running pace"* (98). Dabei beschrieb *Parkinson* kein bisher unbekanntes Leiden, vielmehr integrierte er die Symptome Ruhetremor und Bradykinese, die bislang ungenau unter dem Begriff "Shaking Palsy" zusammengefasst worden waren, zu einem gemeinsamen Syndrom. Seine Erkenntnisse wurden erst Anfang des 20. Jahrhunderts vom französischen Neurologen *Charcot* wieder aufgegriffen und um weitere Symptome, wie nicht-Tremor-assoziierte Formen, erweitert. *Charcot* benannte die Erkrankung als "Maladie de Parkinson" (62).

Heute ist bekannt, dass neben den motorischen Symptomen des Parkinsonismus (Bradykinese, Rigor, Ruhetremor und posturale Instabilität) auch eine Vielzahl von nicht-motorischen Symptomen beim IPS auftreten können: 1) vegetative Symptome (beispielsweise Störungen von Blutdruck, Temperaturregulation, Harnblasenfunktion und sexuellen Funktionen), 2) psychische Symptome (wie vor allem Depression und Impulskontrollstörungen), 3) kognitive Symptome (zum Beispiel frontale Störungen bis hin zur Demenz), 4) Fatigue, 5) olfaktorische Dysfunktion, 6) sensorische Symptome wie Dysästhesien und Schmerzen und 7) Schlafstörungen (insbesondere die REM-Schlaf-Verhaltensstörung). Diese nicht-motorischen Symptome treten oft bereits lange Zeit vor den motorischen Symptomen auf (133).

Für die klinisch zu treffende Diagnosestellung sind folgende Kriterien wegweisend: 1) das Vorliegen eines Parkinsonismus, 2) das Fehlen von Ursachen für symptomatische Parkinson-Syndrome, 3) gutes Ansprechen auf eine Therapie mit L-Dopa sowie 4) kein Hinweis auf andere neurologische Symptome, die eher auf ein atypisches Parkinson-Syndrom hindeuten würden.

Bislang ist nur eine symptomatische Therapie möglich. Hierfür verwendet werden insbesondere Medikamente, die den Dopamingehalt im ZNS erhöhen. Dies geschieht entweder durch Dopamin(analogon)substitution (L-Dopa und Dopaminagonisten) oder Dopaminabbauhemmung (MAO- und COMT-Hemmer). Diese haben einen günstigen Einfluss auf die motorischen Krankheits-symptome. Zusätzlich werden auch antiglutamaterge und anticholinerge Medi-

kamente angewandt. Bei manchen Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsverlauf kann mit tiefer Hirnstimulation am Nucleus subthalamicus oder Globus pallidus internus eine symptomatische Besserung erzielt werden. Auf die nicht-motorischen Symptome haben die beschriebenen Therapieoptionen jedoch kaum Einfluss. Da diese deshalb therapeutisch schlechter zu kontrollieren sind, können sie für die Patienten sehr belastend sein und deren Lebensqualität erheblich einschränken (40).

1.1.3 Familiäre Parkinson-Syndrome

Für etwa 5-10% der Parkinson-Syndrome ließ sich bislang eine eindeutige monogenetische Ursache finden. Bislang sind 13 verschiedene Genloci bekannt, die in Tab. 1.2 genauer dargestellt sind. Das Krankheitsbild der betroffenen Patienten ähnelt in sehr unterschiedlichem Ausmaß dem des IPS, meist ist das Erstmanifestationsalter niedriger und die mit der Krankheit einhergehenden pathologischen Veränderungen sind nicht immer identisch. Zudem schreitet die Krankheit bei manchen Mutationen deutlich schneller voran als beim IPS (49).

Die von diesen Mutationen betroffenen Genloci kodieren für Proteine, deren Dysfunktion für die familiären Parkinson-Syndrome verantwortlich scheint. Auf α -Synuclein (α -Syn), einem präsynaptisch lokalisiertem Protein, wird im Folgenden noch ausführlich eingegangen. Parkin, eine E3 Ubiquitin Protein Ligase, spielt eine wichtige Rolle im Ubiquitin-Proteasom-System. Zusammen mit der mitochondrialen Serin-Threonin-Kinase PINK1 und dem wahrscheinlich am mitochondrialen Stoffwechsel beteiligten Protein DJ-1 scheint es eine wichtige protektive Funktion im Schutz der Mitochondrien vor durch oxidativen Stress verursachten Schäden zu besitzen (110).

Tab. 1.2 Für familiäre Parkinson-Syndrome identifizierte Genloci

| <i>Locus</i> | <i>Erbgang</i> | <i>Erkrankungsalter</i> | <i>Pathologie</i> | <i>Chromosom</i> | <i>Gen</i> |
|--------------|----------------|-------------------------|--|------------------|--|
| PARK 1 | dominant | 40s | nigrale Degeneration mit Lewy-Körpern | 4q21 | α -Synuclein |
| PARK 2 | rezessiv | 20-40 | nigrale Degeneration ohne Lewy-Körper | 6q25 | Parkin |
| PARK 3 | dominant | 60s | nigrale Degeneration mit Lewy-Körper, Plaques und Tangles | 2p13 | ? |
| PARK 4 | dominant | 30s | nigrale Degeneration mit Lewy-Körpern und Vakuolen in hippocampalen Neuronen | 4q21 | α -Synuclein Duplikationen und Triplikationen |
| PARK 5 | dominant | ~ 50 | keine Pathologie bekannt | 4p14 | Ubiquitin C-Terminale Hydrolase L1 |
| PARK 6 | rezessiv | 30-40 | keine Pathologie bekannt | 1p35-37 | PINK 1 |
| PARK 7 | rezessiv | 30-40 | keine Pathologie bekannt | 1p38 | DJ-1 |
| PARK 8 | dominant | ~ 60 | variable α -Syn und tau-Pathologie | 12 cen | LRRK2 |
| PARK 9 | rezessiv | 20-40 | keine Pathologie bekannt | 1p36 | ATP13A2 |
| PARK 10 | dominant ? | 50-60 | keine Pathologie bekannt | 1p32 | ? |
| PARK 11 | dominant ? | spät | keine Pathologie bekannt | 2q34 | ? |
| PARK 12 | x-chromosomal | spät | keine Pathologie bekannt | Zq21 | ? |
| PARK 13 | dominant ? | spät | keine Pathologie bekannt | 2p12 | HTRA2 |

Entnommen aus (49).

1.1.4 Toxininduziertes Parkinson-Syndrom

1983 wurde das plötzliche Auftreten von Parkinsonismus bei jungen heroinabhängigen Patienten vermehrt beobachtet. Man fand heraus, dass alle Patienten sich vorher mit Methyl-Phenyl-Tetrahydropyridin (MPTP) verunreinigte halluzinogene Substanzen appliziert hatten (68). Die Post-Mortem-Hirnschnittanalyse eines der betroffenen Patienten offenbarte Neurodegeneration in der Substantia nigra mit Lewy-Körper-ähnlichen Strukturen in einem zum IPS vergleichbaren

Ausmaß. Diese Veränderungen waren im Gegensatz zur Pathologie beim IPS (siehe unten) jedoch auf die Substantia nigra beschränkt (68). Die toxische Wirkung von MPTP konnte an Mäusen untersucht werden und ist heute das am häufigsten verwendete Tiermodell für nigrostriale Neurodegeneration und Parkinsonismus. So inhibiert der aktive Metabolit MPP⁺ den mitochondrialen Komplex 1, dadurch wird die Elektronentransportkette unterbrochen, resultierend im selektiven Zelltod von dopaminergen Neuronen (33).

1.1.5 Neurophysiologische und -pathologische Grundlagen

Zwei neuropathologische Hauptmerkmale sind beim idiopathischen Parkinson-Syndrom zu finden. Beide sind für die definitive *post mortem* Diagnose des IPS erforderlich:

1) Der Untergang von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra pars compacta (SNpc), deren Fortsätze ins Striatum projizieren. Erst wenn etwa 60% der Neurone abgestorben sind, kommt es zum Auftreten der ersten motorischen Krankheitssymptome. Der aus der Zelldegeneration resultierende Dopaminmangel im Striatum führt zu einem Neurotransmitterungleichgewicht in den motorischen Basalganglienschleifen, wodurch die inhibitorischen Bewegungsimpulse überwiegen. Dadurch wird die Bewegungsinitiierung stark reduziert (33). Für eine detaillierte Darstellung siehe Abb. 1.2.

2) Das Auftreten von eosinophilen Einschlusskörperchen, sogenannter Lewy-Körper, in den überlebenden Neuronen der SNpc sowie vielen weiteren Regionen des peripheren und zentralen Nervensystems. Zum ersten Mal beschrieben wurden diese Veränderungen 1912 von *Friedrich Lewy*, der sie den in Basalganglien, im Kortex, den Spinalganglien sowie in den vegetativen Hirnstammkernen von Parkinson-Patienten entdeckte (55). 1919 stellte *Trétiakoff* dann, nachdem er in Hirnschnitten von Parkinsonpatienten beides gleichzeitig vorgefunden hatte, eine Verbindung zwischen dem an der Depigmentierung der SN ersichtlichen Zelluntergang und den von Lewy gefundenen Einschlusskörperchen her (55). *Trétiakoff* benannte in seiner Arbeit die Körper nach ihrem Entdecker „corps de lewy“ (55).

Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass die Einschlusskörper sowohl intrazellulär (Lewy-Körper) als auch in Axonen (Lewy-Neuriten) auftreten. Ihren Hauptbestandteil stellt α -Synuclein dar (114), doch lassen sich darüber hinaus

noch insgesamt über 70 weitere Proteine, wie z.B. Neurofilamente und Ubiquitin, nachweisen (siehe auch Abb. 1.1) (130). Die Lewy-Pathologie ist pathognomonisch für das IPS, sie ist jedoch auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie auch bei älteren gesunden Menschen, feststellbar. Da das Auftreten der Lewy-Körper nicht zwangsläufig mit Zelluntergang einhergeht, wird angenommen, dass Lewy-Körper einen Schutzmechanismus der Zellen darstellen (99).

Zusätzlich zur Zelldegeneration in der SNpc kommt es beim IPS auch in geringerem Maße zum Untergang von cholinergen und serotoninergen Neuronen, sowie von dopaminergen Neuronen außerhalb der Substantia nigra (13).

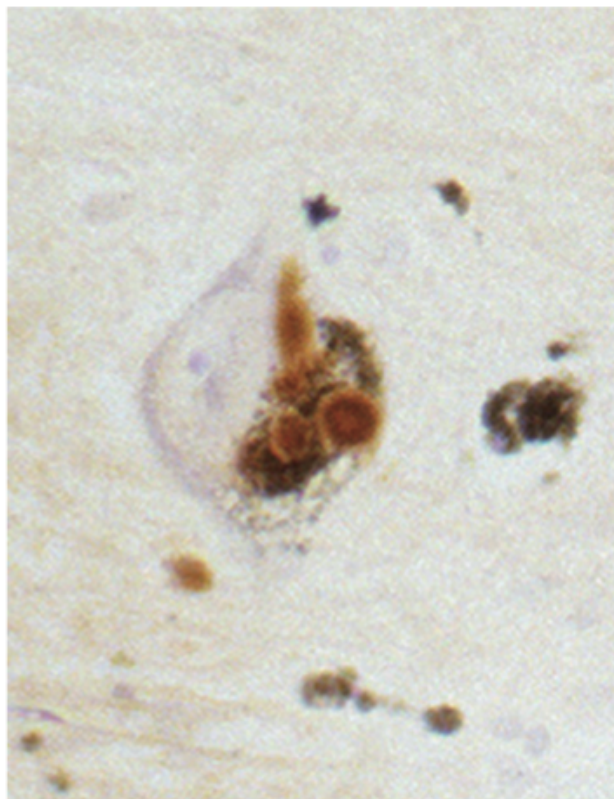


Abb. 1.1 Immunhistochemische Darstellung von α -Syn in Lewy-Körpern
Färbung der SN eines IPS Patienten. Entnommen aus (121).

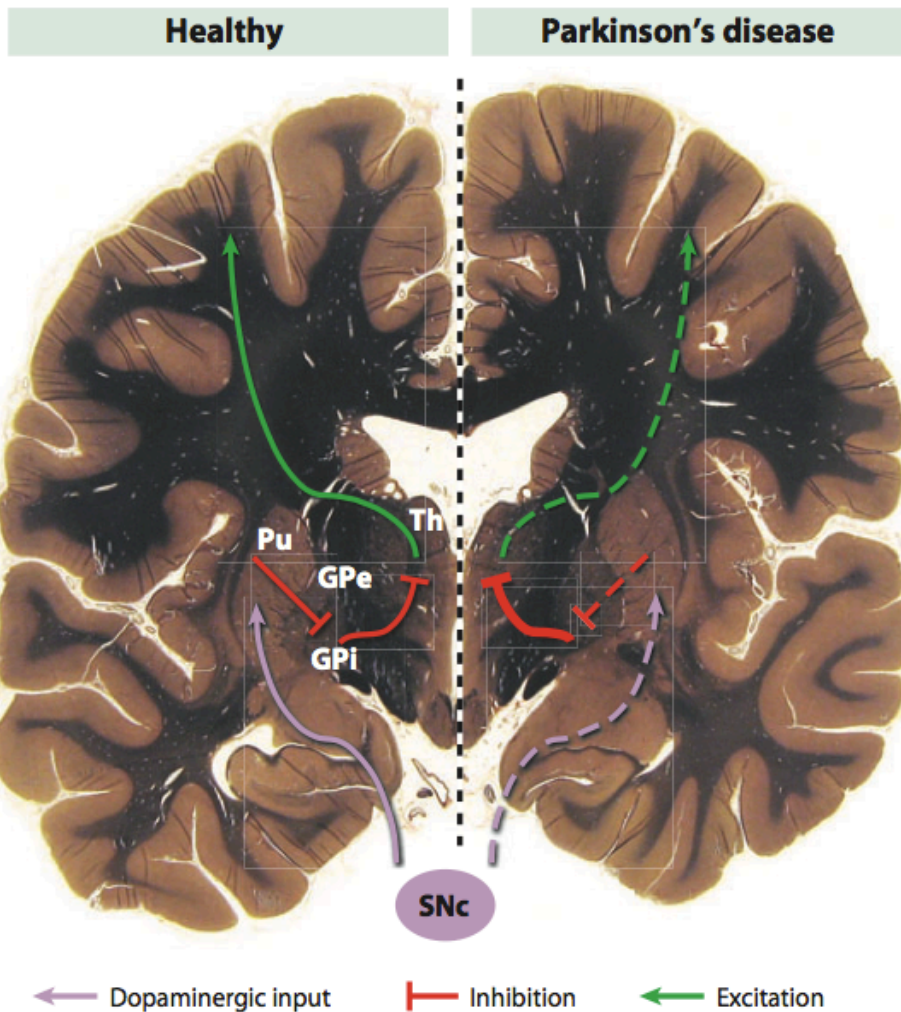


Abb. 1.2 Veränderungen der motorischen Basalganglienschleife

Ausgelöst durch den reduzierten dopaminergen Input aus der Substantia nigra pars compacta. Schematische vereinfachte Darstellung, die nur den direkten Weg abbildet.

Das aus der Substantia nigra pars compacta (SNc) ausgeschüttete Dopamin aktiviert das Putamen (Pu), welches ein Teil des Striatums darstellt. Dieses sendet dann inhibitorische Efferenzen zum Globus pallidus internus (GPI) aus, die dann wiederum die inhibitorischen Efferenzen des GPI zum Thalamus (Th) hemmen, welcher so ungehemmt motorische Kortextareale aktivieren kann. Besteht dagegen ein Dopaminmangel in der SNc, resultiert eine Inhibition der thalamokortikalen Projektion. Der nicht gezeigte indirekte Weg über den Globus pallidus externus (GPe) und Nucleus subthalamicus führt zu einer Inhibition der Bewegungsgenerierung. Unter physiologischen Bedingungen wird er von den dopaminergen Neuronen aus der SNc gehemmt. Bei Dopaminmangel resultiert hier also auch eine inhibitorische Gesamtwirkung. Entnommen aus (110).

1.1.6 Braak-Staging

Nach der Analyse von Post-Mortem-Studien an Hirnpräparaten postulierten *Braak et al.* die Hypothese, dass die Bildung der Lewy-Körpern von zwei Prädilektionsstellen ausgehe und sich von dort entlang anatomischer Bahnen aufsteigend im stets gleichen Muster in sechs Stadien ausbreite. Dabei seien in

den frühen Stadien 1-2 zuerst der Bulbus und Tractus olfactorius, das enterische Nervensystem und der Nucleus dorsalis nervus vagi betroffen. Die Lewy-Körper-Pathologie breite sich dann im Stadium 3 auf die Substantia nigra pars compacta aus, im Stadium 4 auf Amygdala, Nucleus Meynert und Hippocampus und schließlich in den Stadien 5-6 auf den Kortex. Dieses Ausbreitungsmuster könne vor allem das frühe Auftreten der nicht-motorischen Symptome wie Anosmie, Konstipation und REM-Schlaf-Verhaltensstörungen erklären, da in den betreffenden Regionen bereits in den ersten Stadien Lewy-Körper nachweisbar sind. Erste motorische Symptome seien dagegen erst bei Befall der SN im Stadium 3 zu erwarten. Insgesamt solle der Krankheitsverlauf vom Auftreten erster Lewy-Körper an den Prädilektionsstellen bis zum Erreichen des Kortex etwa 20 Jahre betragen (15). Siehe hierfür auch Abb. 1.3.

Hierzu ist jedoch kritisch anzumerken, dass die Ausbreitung der Lewy-Pathologie nicht immer den Verlauf dieser Stadien befolgt und die einzelnen pathologischen Stadien nicht zwangsläufig mit der Schwere der Erkrankung korrelieren (59). So kann auch bei völlig asymptomatischen Menschen eine weit ausgedehnte Lewy-Körper-Verteilung gefunden werden, was darauf hindeutet, dass neuronaler Zelluntergang und Lewy-Pathologie nicht zwingend Hand in Hand gehen müssen (99).

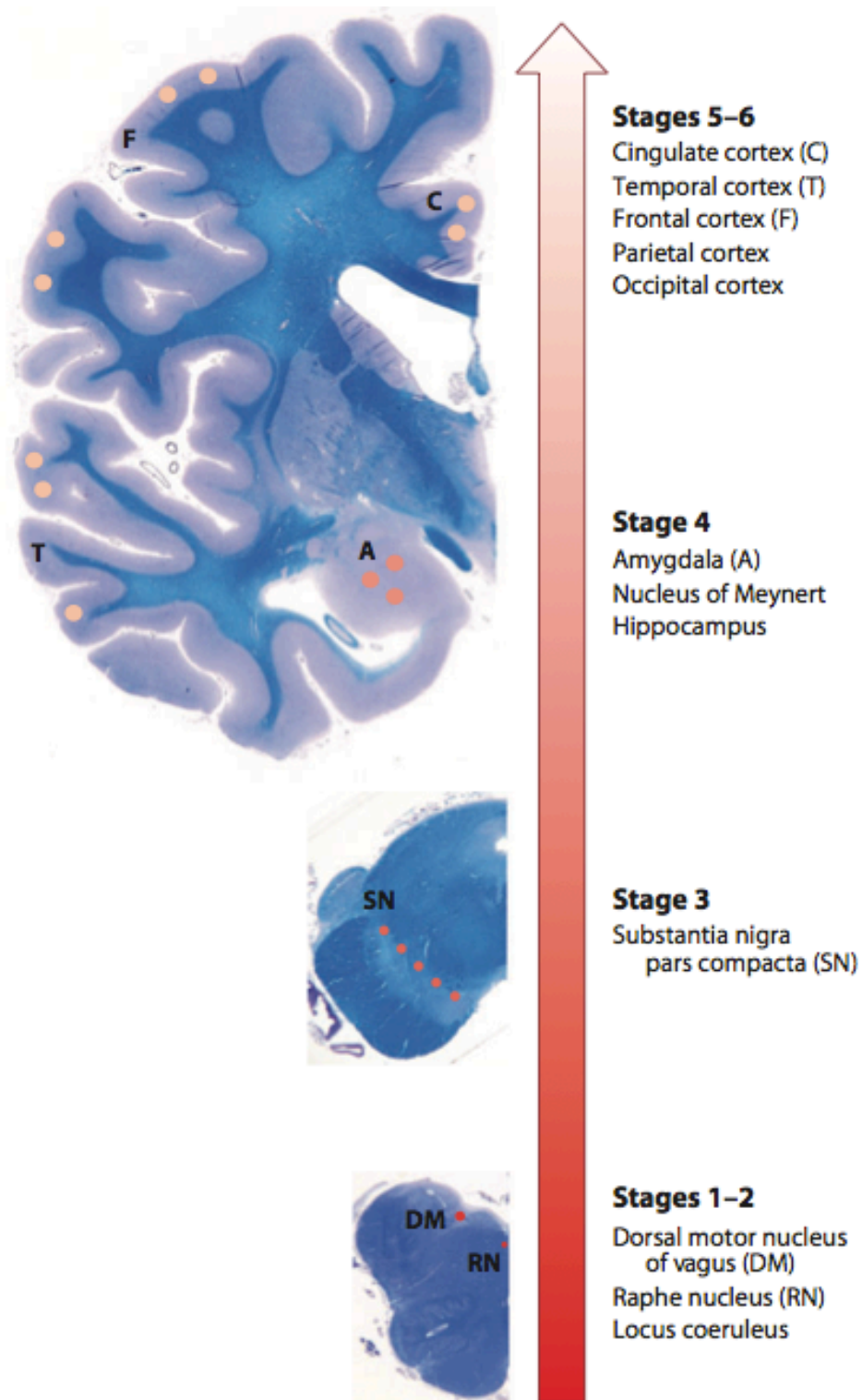


Abb. 1.3 Ausbreitung der Lewy-Pathologie im ZNS nach Braak

Stadien 1-2) Beginnend am unteren Hirnstamm im dorsalen motorischen Vagus Kern, dem Nucleus Raphe und dem Locus coeruleus erreicht die Erkrankung im Stadium 3) die Substantia nigra pars compacta und im Stadium 4) Amygdala, Nucleus Meynert und Hippocampus, in den Stadien 5-6) dann die Hirnrinde. Entnommen aus (110).

1.1.7 Selektive Vulnerabilität dopaminerger SNpc Neurone

Wie bereits beschrieben, ist die Degeneration von dopaminergen Neuronen in der SNpc eines der Hauptmerkmale des IPS. Dagegen sind mesokortikale dopaminerge Neurone im ventralen Tegmentum erst in späten Krankheitsstadien betroffen (33). Warum und wodurch es beim IPS zum spezifischen Untergang dopaminerger Neurone in der SNpc kommt, ist bislang nur ansatzweise verstanden.

Bei Menschen sowie im Tiermodell führt die Injektion des toxischen Stoffes MPTP zur selektiven Degeneration der dopaminergen Neurone in der SNpc. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass in α -Synuclein Knockout-Mäusen die Neurone in der SNpc trotz MPTP-Injektion vital blieben (32). Dies weist auf eine Beteiligung des Proteins α -Synuclein (für Details siehe unten) am dopaminergen Zelluntergang hin.

Die dopaminergen Neurone in der SNpc weisen bestimmte Charakteristika auf, die sie besonders anfällig gegenüber oxidativem Stress machen (nach (120, 127)):

- 1) Sie haben besonders lange Axone, was ihren Stoffwechselbedarf erhöht und damit oxidativen Stress begünstigt.
- 2) Dopamin ist ein potentiell gefährlicher Neurotransmitter, da es Redox-Potential besitzt, durch welches schädliche Sauerstoffradikale gebildet werden können. Normalerweise wird Dopamin deshalb durch den vesikulären Monoamintransporter VMAT 2 rasch in Vesikel verpackt. Wird dieser jedoch beeinträchtigt, können vermehrt Dopamin-Autooxidationsprodukte entstehen.
- 3) Die Schrittmacheraktivität der SNpc Neurone wird von L-Typ Kalziumkanälen gesteuert, die in tonischer Aktivität sehr hohe Kalziumspikes generieren, die kaum betroffenen dopaminergen Neurone im ventralen Tegmentum hingegen von Natriumkanälen. Deshalb ist es möglich, dass kalziumabhängige neurotoxische Prozesse bei der Krankheitsentstehung eine Rolle spielen.

Diese besonderen Voraussetzungen der SNpc könnten im Zusammenhang mit dem Einfluss von aggregierten Proteinen oder Inflammation im Rahmen einer "Multiple-Hit"-Schädigung die selektive Degeneration der SNpc Neurone erklären (120).

1.1.8 Pathogenese des IPS

Bislang ist die Entstehung des IPS nur ansatzweise verstanden. Aktuell wird ein multifaktorielles Entstehungsmodell propagiert, bestehend aus den drei ätiologischen Hauptkomponenten I.) genetischer Prädisposition, II.) Umwelttoxineinwirkung und III.) dem Einfluss des natürlichen Alterungsprozesses. Diese Einflüsse sollen zu α -Synuclein-Aggregation, Neuroinflammation, oxidativen Schäden und mitochondrialer Dysfunktion sowie zur Störung der Synapsenfunktion führen (110, 127). Auf den für diese Arbeit relevanten derzeitigen Kenntnisstand zu diesen Pathomechanismen wird im Folgenden näher eingegangen.

1.2 α -Synuclein

α -Synuclein bildet zusammen mit β - und γ -Synuclein eine Proteinfamilie, die mit hochkonservierter Struktur in vielen verschiedenen Spezies zu finden ist. 1988 wurde erstmals ein Protein dieser Familie beschrieben, als Bestandteil des elektrischen Organs des Torpedorochens (*Torpedo californica*). Damals wurde angenommen, dass es sowohl Bestandteil von Synapsen als auch von Zellkernen ist, was zur Benennung *Synuclein* führte. Das Vorkommen in Zellkernen konnte jedoch später nicht bestätigt werden (26). 1993 wurde dann ein Teil des damals noch nicht bekannten α -Synucleins als Bestandteil von Amyloidplaques in Alzheimer-Patienten im Menschen entdeckt und deshalb *Non-Amyloid β Component* (NAC) bezeichnet, das Vorläuferprotein analog *Non-Amyloid β Component Precursor* (NACP) (122). Die Verbindung zwischen NACP und den Synucleinen erfolgte kurze Zeit später.

Erst 1997 wurde dann α -Synuclein als Hauptbestandteil der Lewy-Körper identifiziert (114). Zur gleichen Zeit wurden auch die ersten Mutationen im für α -Synuclein kodierenden SNCA Gen als Verursacher familiärer Parkinson-Syndrome entdeckt (100), was beides auf einen Zusammenhang zwischen α -Synuclein und der Pathogenese des IPS hindeutete.

1.2.1 Vorkommen

α -Synuclein wird im gesamten Nervensystem exprimiert, bevorzugt kommt α -Synuclein aber in den präsynaptischen Endigungen in der Nähe der synaptischen Vesikel vor (121). Es stellt den Hauptbestandteil der oben beschriebenen

Lewy-Körper dar (114).

Das Protein liegt sowohl in freier löslicher Form im Zytosol vor, als auch membran- oder vesikelgebunden (70, 71).

Zudem konnte α -Synuclein auch extrazellulär in nanomolekularen Konzentrationen im Liquor und Blutplasma von Gesunden sowie an IPS-Erkrankten nachgewiesen werden. Zwischen diesen beiden Gruppen bestanden keine Unterschiede bezüglich der Quantität des extrazellulären α -Synucleins (42). Daraufhin wurde ein ungewöhnlicher Exozytosemechanismus entdeckt, der in Vesikeln verpacktes α -Synuclein unabhängig von Endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat aus der Zelle sezerniert (71). Nur ein kleiner Teil des zytosolischen α -Synucleins liegt in Vesikeln vor, dieser Teil erwies sich in Experimenten als besonders aggregationsanfällig. Die Sekretion von α -Synuclein in den Extrazellulärraum war unter Stressbedingungen, wie proteasomaler und mitochondrialer Blockade, gesteigert (71).

1.2.2 Struktur

α -Synuclein ist ein 140 Aminosäuren (AS) langes Protein mit einem Molekulargewicht von 14,5 Kilodalton (kDa). In der Regel liegt es ungefaltet vor, was bedeutet, dass es keine definierte Sekundärstruktur besitzt. Unter bestimmten Umständen kann α -Synuclein jedoch sowohl α -Helices als auch β -Sheet-Konformation ausbilden (siehe unten). Für eine Darstellung der Aminosäuresequenz siehe Abb. 1.4. Strukturell kann es in 3 funktionelle Domänen eingeteilt werden (siehe Abb. 1.5):

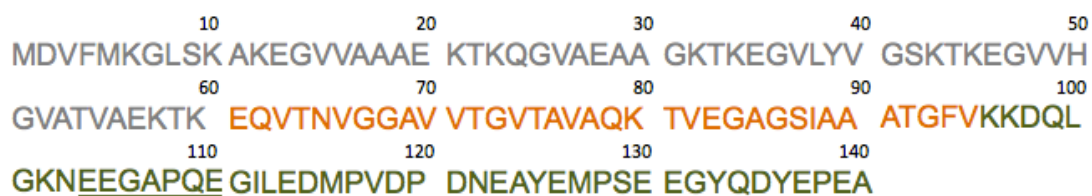


Abb. 1.4 Aminosäuresequenz von α -Syn

Grau dargestellt ist die N-terminale Domäne. Die NAC-Region ist in orangener Farbe markiert. Die C-terminale Domäne ist in grün dargestellt, die bei α -Synuclein 112 fehlenden C-terminalen Aminosäuren sind unterstrichen.

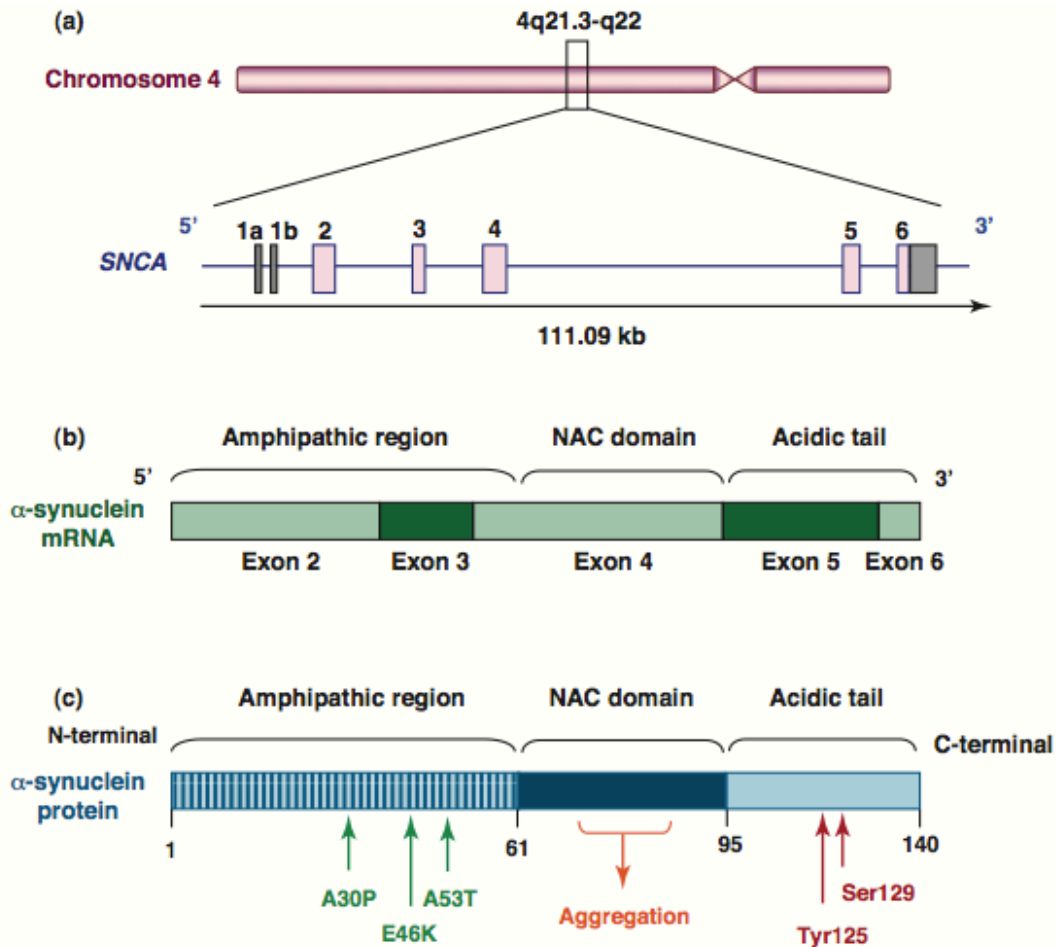


Abb. 1.5 SNCA Gen und α -Syn

a) Das auf Chromosom 4 liegende SNCA Gen. b) Die α -Synuclein mRNA. c) Das Protein α -Synuclein, unterteilt in die funktionellen Domänen amphipathische N-terminale Domäne, zentrale NAC-Region und C-terminale saure Domäne. In der N-terminalen Domäne sind die drei Mutationen A30P, E46K und A53T gelegen, die familiäre Parkinson-Syndrome verursachen. Die NAC-Region ist besonders aggregationsanfällig. In der C-terminalen Domäne liegen Ansatzpunkte für posttranslationale Modifizierungen, wie Phosphorylierung an Tyr125 oder Ser129. Entnommen aus (127).

N-terminale Domäne (Aminosäuren 1-60):

Mehrere unvollständige Aminosäurerepeats des Motifs KTKEGV finden sich in der N-terminalen Domäne. Diese Repeats ähneln der lipidbindenden Domäne von Apolipoproteinen. Im Zuge der Bindung an Membranen und Proteinen kann die normalerweise ungefaltete N-terminale Domäne amphipathische Helices ausbilden (26). Funktionell ist sie für die Bindung von Proteinen wichtig (96). Zudem liegen die drei familiäre Parkinson-Syndrome verursachenden Missense-Mutationen (A30P, E46K und A53T) alle in der N-terminalen Domäne. Durch N-terminale Trunkierung wird die Fibrillierung des Proteins beschleunigt (63).

NAC-Region (Aminosäuren 61-95):

Die hydrophobe NAC-Region stellt den zentralen Anteil des Proteins dar, sie ist regelhaft ungefaltet. Zuerst wurde diese Domäne als Bestandteil der Amyloidplaques von Alzheimer-Patienten entdeckt (122), dieser Fund konnte jedoch nicht ausnahmslos bestätigt werden (30). Ein Teil der NAC-Region besitzt amyloidogenes Potential, was bedeutet, dass über die Ausbildung einer β -Sheet-Konformation eine progressive Aggregation ausgelöst wird, die zur Bildung von Fibrillen führt (9, 58). Zudem wurde gezeigt, dass die NAC-Region zytotoxisch wirken kann. Toxische NAC-Fragmente wiesen dabei eine β -Sheet-Konformation auf, was auf die Bedeutung dieser Strukturänderung für die Ausbildung von Zytotoxizität hinweist (10, 41).

C-terminale Domäne (Aminosäuren 96-140):

Die gewöhnlich ungefaltete C-terminale Domäne enthält viele saure Aminosäuren (96). Ihre Funktion soll darin bestehen, das gesamte Protein löslich zu halten und für andere Proteine als Chaperon zu fungieren (96, 123).

In Lewy-Körpern und Lewy-Neuriten fand man sowohl das Gesamtprotein α -Synuclein als auch C-terminal trunkiertes α -Synuclein. Letzteres kommt auch unter physiologischen Bedingungen im ZNS vor, es entsteht durch proteolytische Spaltung des Gesamtproteins. C-terminal trunkiertes α -Synuclein bildet wesentlich schneller, und im Vergleich zu α -Synuclein bereits in niedrigeren Konzentrationen, eine β -sheet-Konformation mit konsekutiver Fibrillenbildung aus. Zudem beschleunigt es die Aggregation des Gesamtproteins (74, 107).

Darüberhinaus sind in der C-terminalen Domäne posttranslationale Veränderungen wie Nitrierung (125) und Phosphorylierung (44) beschrieben worden, die die Aggregationstendenz von α -Synuclein steigerten.

α -Synuclein 112 (NACP 112)

Das für α -Synuclein kodierende SNCA-Gen besteht aus 5 Exons. Durch alternatives Spleißen können verschiedene Isoformen erzeugt werden. Insgesamt sind drei physiologisch vorkommende Formen bekannt: das am häufigsten exprimierte Gesamtprotein α -Synuclein 140 sowie die seltener vorkommenden, durch alternatives Spleißen von Exon 3 bzw. 5 entstehenden, Isoformen α -Synuclein 126 und α -Synuclein 112 (α -Syn 112). Letzteres entsteht, wenn das

Exon 5 nicht abgelesen wird, dadurch fehlen die C-terminalen Aminosäuren 103-130 (5). Bei an Demenz mit Lewy-Körpern (DLB) erkrankten Patienten wurde eine Überexpression von α -Syn 112 gefunden (6). α -Syn 112 liegt im Gegensatz zu α -Syn 140 vorüberwiegend in membrangebundener Form vor. Das zur Entstehung von α -Syn 112 führende alternative Spleißen konnte oxidationsvermittelt ausgelöst werden. Überexpression von α -Syn 112 führte im Zellkulturmodell zu gesteigerter proteasomaler Dysfunktion und Zelltod (61). In vitro aktivierte α -Syn 112 das Komplementsystem, α -Syn 140 dagegen nicht. Dies ist Hinweis darauf, dass α -Syn 112 an der Initiierung der angeborenen Immunantwort beteiligt zu sein scheint (65).

1.2.3 Funktion

α -Synuclein kann mit biologischen und synthetischen Membranen und einer Vielzahl von Proteinen agieren (123).

Das vorwiegend in den präsynaptischen Endigungen lokalisierte Protein scheint eine wichtige Rolle in der Regulierung des präsynaptischen Pools und der Neurotransmitterfreisetzung zu spielen:

α -Synuclein Knockout-Mäuse zeigen unter normalen Bedingungen einen gesunden Phänotyp (1). Bei genauerer Betrachtung der synaptischen Reizantwort im Hippocampus fand sich aber Folgendes: Die Reizantwort auf kurze Hochfrequenzstimulation, vereinbar mit der Rekrutierung von bereits angedockten Vesikeln, war im Vergleich zu Kontrollen unverändert. Bei länger andauernder Stimulation, die auch Reservevesikel aufbraucht, zeigte sich jedoch eine verzögerte Reizantwort der α -Synuclein defizienten Mäuse. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass sowohl die gebundenen Vesikel als auch die Vesikel-Reservepools bei diesen Tieren schneller erschöpft sind (19, 87).

Gleichzeitig fand man auch bei moderat α -Synuclein überexprimierenden Mäusen eine Reduktion des synaptischen Vesikelpools in hippocampalen Neuronen, welche auf einen Defekt der Vesikelbildung zurückgeführt werden konnte (90).

Bei α -Synuclein Knockout-Mäusen ließ sich eine erhöhte Dopaminfreisetzung in der SNpc beobachten, diese war hingegen bei α -Synuclein überexprimierenden Mäusen reduziert (90). Daraus lässt sich spekulieren, dass α -Synuclein als

negativer Regulator der Dopaminvesikelfreisetzung dienen könnte. Für eine schematische Darstellung dieser Hypothese siehe Abb. 1.6.

Die Arbeitsgruppe von *Südhof et al.* entdeckte kürzlich die Rolle der Synuclein-Familie als Chaperone im Aufbau des Soluble-NFS-Attachment-Protein-Receptor (SNARE)-Komplex (18). Diese Funktion wurde jedoch erst mit steigendem Lebensalter der untersuchten Mäuse unerlässlich für die Aufrechterhaltung der synaptischen Funktion. Der SNARE-Komplex reguliert die wiederholte Freisetzung von Neurotransmittern und ist damit wichtig für die synaptische Funktion. Daraus ergibt sich ein weiterer Hinweis auf die physiologische Bedeutung von α -Synuclein im Aufbau des SNARE Komplexes im alternden Organismus.

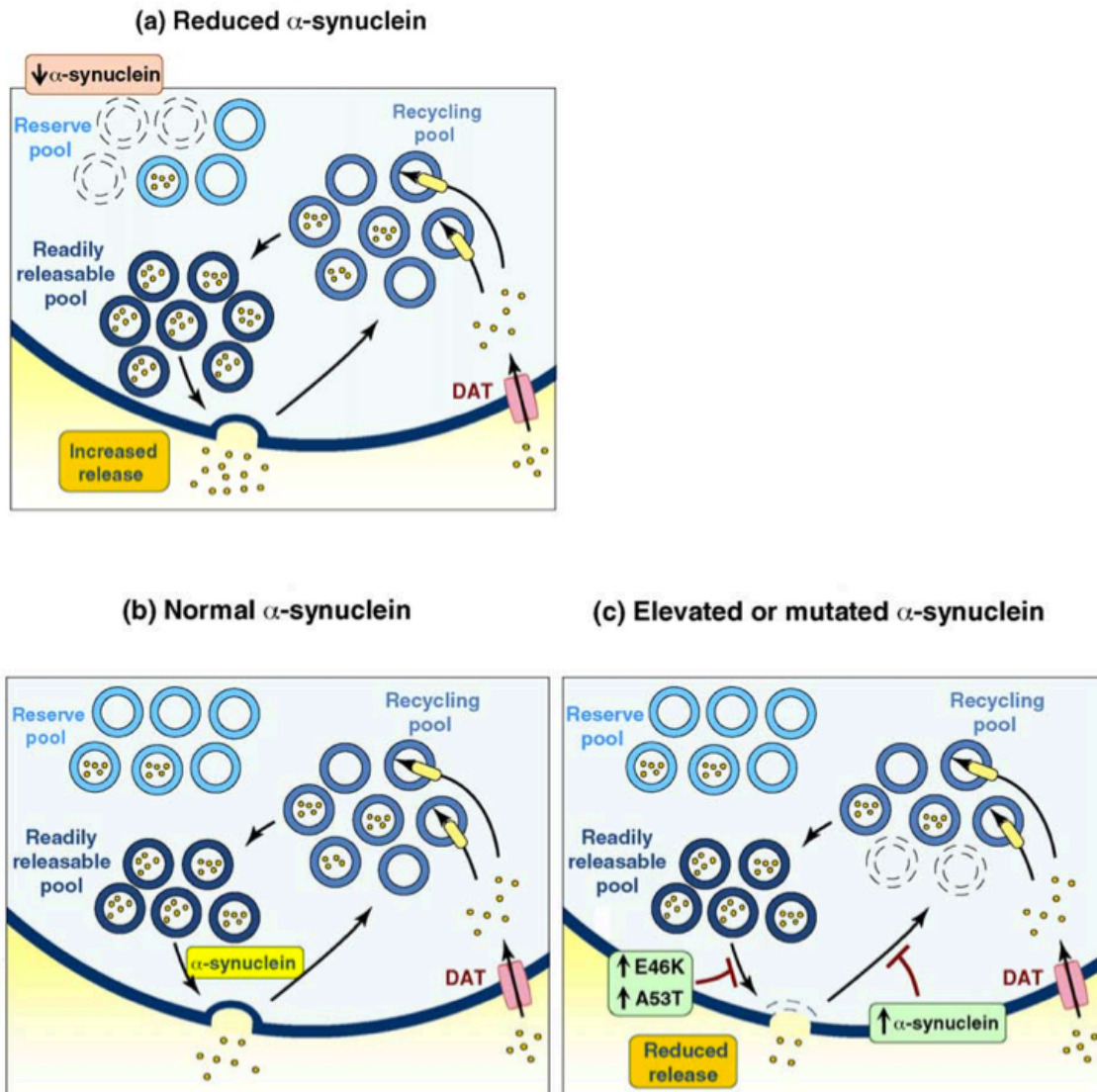


Abb. 1.6 **Regulierung der präsynaptischen Vesikel**

Mögliche Rolle von α -Synuclein an der Regulierung der präsynaptischen Vesikel in Abhängigkeit vom α -Synuclein Gehalt (Schematisches Modell).

a) Bei reduziertem α -Synuclein Gehalt nimmt die Verfügbarkeit des Reservepools ab. Gleichzeitig sind mehr Vesikel zur Freisetzung bereit, dies kann zu einer erhöhten Dopaminfreisetzung führen.

b) Unter physiologischen Bedingungen soll α -Synuclein eine Rolle in der Regulation der Verfügbarkeit der verschiedenen Vesikelpools sowie am Andocken und der Fusion der Vesikel spielen.

c) Bei erhöhtem α -Synuclein Gehalt oder den α -Synuclein Mutationen E46K und A53T wird weniger Dopamin freigesetzt. Dies könnte durch Beeinträchtigung der Exozytose oder Reduktion der Vesikelverfügbarkeit im Recyclingpool bedingt sein. Entnommen aus (127).

1.2.4 Konformation und Aggregation

Wie schon erwähnt, liegt α -Synuclein in der Regel ungefaltet ohne definierte Sekundärstruktur vor. Es kann jedoch abhängig von den jeweiligen Umweltbedingungen sehr variable Konformationen einnehmen. Mögliche Konformationen

in vitro (abgeändert nach (123)):

- 1) Die physiologische *ungefaltete Form*.
- 2) Durch Einfluss von diversen Umweltfaktoren (niedriger pH, hohe Temperatur, geringe Konzentration von organischen Lösungsmitteln, verschiedenen Metallionen und Pestiziden) kann eine *globuläre Struktur* eingenommen werden.
- 3) Die membrangebundene Form besitzt einen stark erhöhten Anteil an *α -helikaler Konformation* in der N-terminalen Domäne.
- 4) Durch Alkohole und andere organische Lösungsmittel werden *α -helikale und β -Sheet-Konformation* induziert.
- 5) Durch langandauernde Inkubation bei hohen Temperaturen werden *Dimere und Oligomere* ausgebildet.
- 6) Es gibt verschiedenartige *lösliche Oligomere*, die bevorzugt von posttranslational nitriertem α -Synuclein ausgebildet werden, sowie bei Koinkubation mit Metallionen.
- 7) Zudem gibt es verschiedene *unlösliche große Aggregate: amorphe Aggregate und Fibrillen*.

Aufgrund der Fülle dieser unterschiedlichen Konformationen schlug Uversky das Konzept des "Protein-Chamäleons" vor, da α -Synuclein seine Sekundärstruktur stark dynamisch an die jeweiligen Umweltbedingungen anpasst (123).

Eines der Hauptmerkmale des IPS ist das Auftreten der α -Synuclein-haltigen Lewy-Körper, die vor allem unlösliches fibrilliertes α -Synuclein enthalten. Deshalb ist die Frage, welche Bedingungen *in vivo* zur Aggregation des Proteins beitragen.

Alle oben aufgeführten Faktoren beschleunigten auch *in vivo* die α -Synuclein-Fibrillenbildung. Diese läuft ähnlich zu anderen amyloidogenen Erkrankungen ab, die durch Ausbildung von entweder extrazellulären Amyloidaggregaten oder intrazellulären Einschlusskörpern gekennzeichnet sind. Dazu zählen beispielsweise die Amyloid β -Aggregation bei Morbus Alzheimer und die Aggregation von Prionprotein bei der Creutzfeld-Jakob-Erkrankung (57). Dabei lagern sich im Falle des α -Synucleins die Monomere mit β -sheet-Struktur zu Multimeren, dann zu löslichen Oligomeren, daraufhin zu Protofibrillen und schließlich zu unlöslichen Fibrillen zusammen. Die Fibrillen werden dann in Lewy-Körper eingebaut, dem pathologischen Charakteristikum des IPS (131). Für eine schematische Darstellung der α -Synuclein-Aggregation siehe Abb. 8.

Auch eine erhöhte α -Synuclein Konzentration ohne zusätzliche endogene oder exogene Faktoren führte zu einer erhöhten Fibrillierung des Proteins (124). Diese tritt beispielsweise bei familiären Parkinson-Syndromen mit Genduplikationen und -triplikationen auf.

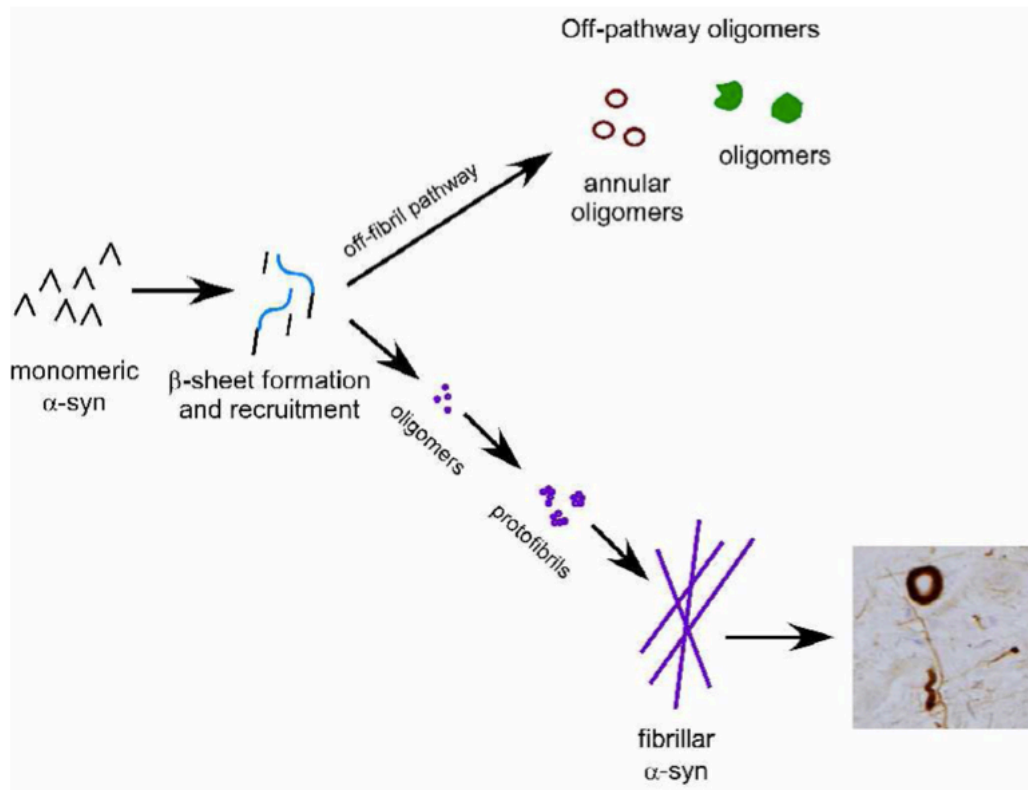


Abb. 1.7 Aggregation von α -Syn

Natives monomeres α -Synuclein liegt größtenteils unstrukturiert vor. Unter bestimmten Umständen kann es seine Struktur verändern und eine β -sheet Konformation annehmen. Von dieser Form aus gibt es zwei mögliche Weiterentwicklungswege, den *Nicht-Fibrillierungsweg* und den *Fibrillierungsweg*. Der *Nicht-Fibrillierungsweg* kann zur Bildung von ringförmigen Oligomeren sowie weiteren Oligomerformen führen, die sich beide nicht mehr zu Fibrillen weiterentwickeln. Der *Fibrillierungsweg* führt über intermediäre Formen, wie lösliche Oligomere und Protofibrillen dann zu unlöslichen reifen Fibrillen, die sich zu Lewy-Körpern weiterbilden können. Schematische Darstellung aus (131).

1.2.5 Toxizität

Die α -Synuclein-Aggregation wird als ein wichtiger Pathomechanismus beim IPS angenommen. Die Frage ist jedoch, ob und wie dieser zur Neurodegeneration führt. Nach dem aktuellen Wissensstand wird angenommen, dass die löslichen Oligomere und Protofibrillen das toxische Intermediat darstellen, während Lewy-Körpern eine protektive Funktion zugeschrieben wird (99). Argumente für die Toxizität der Oligomere (erweitert nach (28)):

- 1) Die ein familiäres Parkinson-Syndrom auslösende SNCA Mutation A30P führt zu einer beschleunigten Oligomerisierung, gleichzeitig wird die Fibrillierung jedoch verlangsamt (27).
 - 2) In Zellkulturmodellen wird die Toxizität von α -Synuclein auch ohne das Vorliegen großer Aggregate beobachtet (135).
 - 3) Eine nachweisbare Aggregation findet auch nach dem Zelltod in vitro statt (50).
 - 4) Transgene α -Synuclein überexprimierende Mäuse entwickeln Neurodegeneration, aber keine fibrillären Aggregate (28).
 - 5) Außer Lewy-Körpern gibt es noch viele kleinere α -Synuclein Aggregate, die bevorzugt an der Präsynapse lokalisiert sind. In Patienten mit DLB wurden 90% der α -Synuclein Aggregate außerhalb von Lewy-Körpern gefunden (105).
- Es wird angenommen, dass der toxische Mechanismus der Oligomere darin besteht, dass sie über das Einfügen von Poren in die Zellmembran die Zellpermeabilität derart erhöhen, dass die Zellen degenerieren (31, 128).

1.2.6 Bedeutung für familiäre Parkinson-Syndrome und IPS

Mehrere Mutationen im α -Synuclein-Gen SNCA konnten als Ursache von genetischen Parkinson-Syndromen gefunden werden.

- 1) Drei Missense Mutationen im N-terminalen Anteil des Proteins: A53T, A30P und E46K (67, 100, 137), die alle die α -Synuclein Aggregation in vitro beschleunigen (nicht unbedingt jedoch die Fibrillierung) (27).
- 2) Duplikationen bzw. Triplikationen des Gens (22, 56, 112).
- 3) Auch durch α -Synuclein Überexpression in transgenen Mäusen und neuronalen Zelllinien konnten manche Merkmale des IPS nachgestellt werden (72).
- 4) Kürzlich durchgeführte „Genome-wide association Studien“ (GWAS) zeigten bei IPS-Patienten einen Zusammenhang zwischen häufigen „Single Nucleotid Polymorphismen“ im SNCA Locus und der Erkrankung (103, 111).

Das weist darauf hin, dass nicht nur bei den seltenen familiären Parkinson-Syndromen, sondern auch beim IPS genetische α -Synuclein-Mutationen eine Rolle spielen. Damit bestünde auch eine ätiologische Verbindung zwischen der α -Synuclein-Dysfunktion beim IPS und den familiären Parkinson-Syndromen.

1.2.7 Synucleinopathien

Auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen werden α -Synuclein-Aggregate gefunden, deshalb werden diese Krankheiten unter dem Überbegriff "Synucleinopathien" zusammengefasst. Die häufigsten Synucleinopathien sind neben dem IPS die Demenz mit Lewy-Körpern (DLB) und die Multisystematrophie (MSA) (113).

1.3 Antikörper und Immunisierung im IPS

Antikörper werden von Plasmazellen produziert. Sie zirkulieren im Blut oder befinden sich auf der Oberfläche von B-Lymphozyten. Die löslichen Antikörper werden auch Immunglobuline (Ig) genannt, da sie bei der Plasmaelektrophorese in der γ -Globulinfraction nachweisbar sind. Man unterscheidet zwischen fünf Immunglobulinhauptklassen, namentlich IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. In dieser Arbeit wurde vornehmlich mit IgG-Antikörpern gearbeitet, deshalb noch eine kurze Zusammenfassung zu deren Aufbau:

Immunglobulin G besteht aus vier symmetrischen Ketten, die man anhand des unterschiedlichen Molekulargewichts in zwei leichte und zwei schwere Ketten trennen kann. Die zwei antigenbindenden Anteile des IgG werden Fab-Fragmente genannt, der Anteil, der Abwehrmechanismen aktivieren kann, Fc-Fragment. Siehe hierzu auch Abb. 1.8. Antikörper sind insbesondere zur Abwehr von Krankheitserregern wichtig, so können sie diese neutralisieren oder opsonieren, aber auch die Aktivierung von Komplementsystem oder T-Lymphozyten und Makrophagen anregen (76).

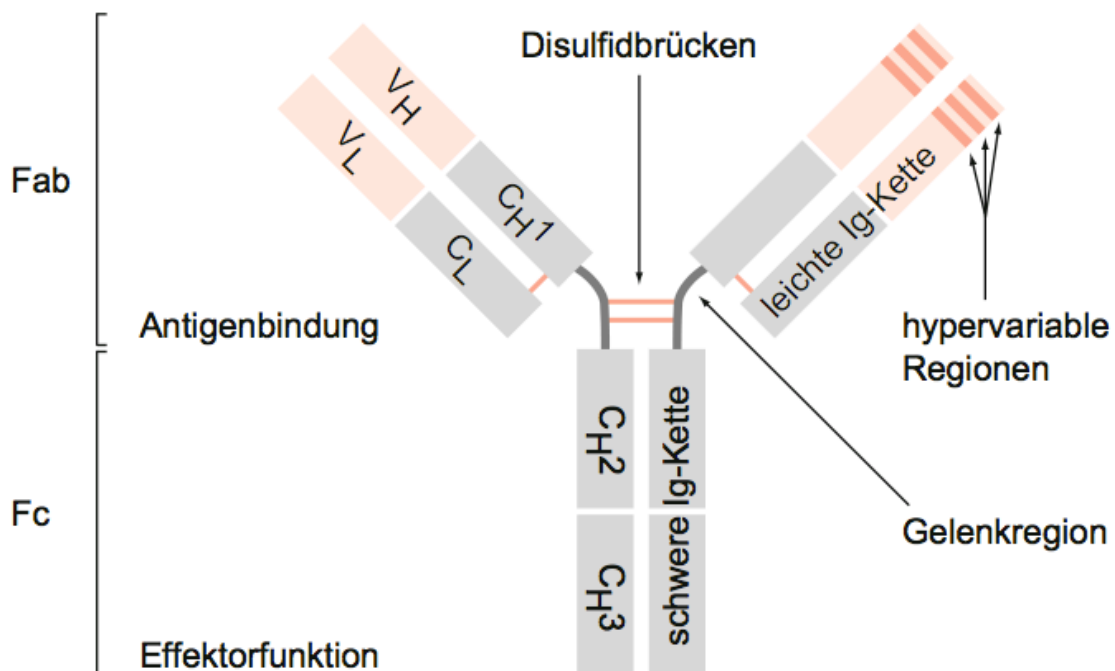


Abb. 1.8 Aufbau von IgG (schematische Darstellung)

Struktur von IgG. Die vier symmetrischen Ketten können in je zwei leichte und zwei schwere Ketten unterschieden werden. Diese unterteilt man wiederum in variable und konstante Regionen. Die Gelenkregion verbindet die sogenannten Fab (fragment of antigen binding) - und Fc (constant fragment) - Fragmente. Die zwei Antigenbindungsstellen werden von hypervariablen Domänen der leichten und schweren Kette gebildet. Die biologischen Effektorfunktionen werden von den Fc-Fragmenten vermittelt: C: konstante Domäne; H: schwere Ig-Kette; L: leichte Ig-Kette; V: variable Domäne. Entnommen aus (106).

1.3.1 IVIG

Emil von Behring entdeckte 1890 die Rolle von Immunglobulinen in der Behandlung von toxin-vermittelten Erkrankungen. In der Folgezeit wurden Immunglobuline zur Prophylaxe und Therapie infektiöser Erkrankungen eingesetzt, später auch zur Behandlung von Immunglobulinmangelsyndromen. Um eine bessere Applikation zu gewährleisten, wurden intravenöse Immunglobuline (IVIG) gewonnen, welche ein fraktioniertes Blutprodukt aus menschlichem Blutplasma darstellen und intravenös verabreicht werden können (116). IVIG enthalten vor allem Immunglobulin G (IgG). Bei der Behandlung von zwei Kindern, die sowohl an Hypogammaglobulinämie als auch an der autoimmunen Erkrankung idiopathische thrombozytopenische Purpura litten, stellte sich heraus, dass IVIG auch einen immunmodulatorischen Effekt besitzt.

Schon 1982 wurden IVIG-Präparate in der Therapie der Multiplen Sklerose eingesetzt, kurz danach auch bei Myasthenia Gravis, chronischer inflammatori-

scher Polyneuropathie und dem Guillain-Barré-Syndrom. Seitdem ist die Anzahl der mit IVIG behandelten Erkrankungen kontinuierlich gestiegen (116).

Obwohl IVIG seit Jahren erfolgreich angewendet wird, sind die genauen Wirkmechanismen für die von IVIG verursachte Herunterregulierung der Immunantwort noch nicht vollständig verstanden. Die Effekte von IVIG beruhen entweder auf der eigenständigen Wirkung des IgG-Moleküls oder auf anderen IgG-unabhängigen immunmodulatorischen Komponenten. IVIG beeinflusst sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem. Als potentielle Zielstrukturen für IVIG zählen unter anderem 1) Hemmung der Komplementsystemaktivierung, 2) Modulation der Zytokinausschüttung, 3) Blockade des makrophagenaktivierenden Fc-Rezeptors auf diversen Zellen, 4) Bereitstellung von neutralisierenden antiidiotypischen Antikörpern sowie 5) Beeinflussung der Aktivierung und Differenzierung von T- und B-Zellen.

Insbesondere die $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Zytotoxizität konnte durch IVIG gehemmt werden (53, 116). Gleichzeitig kann IVIG aber auch proinflammatorische Wirkungen wie Steigerung der $\text{TNF}\alpha$ -Expression oder Aktivierung des Komplementsystems anregen (39, 108). Aufgrund der sehr vielfältigen und nicht ausschließlich anti-inflammatorischen Wirkmechanismen von IVIG ist für eine spezifischere immunmodulatorische Therapie ein besseres Verständnis der Pathophysiologie der zu behandelnden Erkrankungen von Nöten. Mit diesem könnten dann gezieltere Therapiemöglichkeiten entwickelt werden.

1.3.2 Natürlich vorkommende Autoantikörper

Lange Zeit wurde angenommen, dass Autoantikörper ausschließlich pathologische Eigenschaften im Rahmen autoimmuner Erkrankungen besitzen.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass natürlich vorkommende Autoantikörper (nAK) im Serum von Gesunden nachgewiesen werden können. Wie oben erwähnt, bilden sie einen Bestandteil von IVIG-Präparaten. Ihre Generierung hängt nicht von exogenen Antigenstimuli ab. In der Regel besitzen sie eine niedrige bis mittlere Affinität und sind polyreaktiv. Zwar reagieren sie auch mit an Autoimmunerkrankungen beteiligten Autoantigenen wie Insulin, DNA und basischem Myelinprotein, unterscheiden sich von den dabei beteiligten Autoimmun-Antikörpern jedoch durch Quantität und Epitopspezifität. nAKs scheinen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität zu spielen, sie können bereits

vor Aktivierung der erworbenen Immunantwort pathogene Antigene erkennen (109).

Gleichzeitig wurde auch die regulatorische Funktion der nAKs in der Zellhomöostase beschrieben, nAKs identifizierten dabei apoptotisches Zellmaterial und bereiten so dessen Phagozytose vor (23, 25).

Die Arbeitsgruppe von *Papachroni et al.* zeigte, dass α -Synuclein-Antikörper sowohl im Serum von 31% der gesunden Kontrollpersonen als auch bei 65% der Parkinsonpatienten zu finden waren (92). Dabei war jedoch kein signifikanter quantitativer Unterschied zwischen der Häufigkeit der α -Synuclein-Antikörper in Kontrollgruppe und den an IPS Erkrankten (48% wiesen hier α -Synuclein-Antikörper auf) festzustellen. Im Gegensatz dazu fanden sich signifikant häufiger Antikörper im Serum von an familiären Parkinson-Syndromen Erkrankten (90% dieser Patienten besaßen α -Synuclein-Antikörper). Die Antikörper reagierten mit dem Peptid in ganzer Länge, was auf multiepitope Antikörper hinweist. Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen Antigenizität, Antikörpertitern und krankheitsassoziierten Faktoren wie Erkrankungsalter, Erkrankungsstadium und Pestizidbelastung.

Kürzlich zeigte eine weitere Arbeitsgruppe, dass bei IPS Patienten im Frühstadium die Immunantwort gegen monomeres α -Synuclein im Vergleich zu gesunden Kontrollen und IPS-Patienten im Spätstadium der Erkrankung stark erhöht ist. Dagegen war die Immunantwort gegen fibrilläres α -Synuclein in der Kontrollgruppe am höchsten, leicht erniedrigt bei den IPS-Patienten im Frühstadium, und im Spätstadium dagegen deutlich erniedrigt. Eine Immunantwort gegen oligomeres α -Synuclein ließ sich nur in einigen Testseren finden, es konnte daraus keine Korrelation zum Krankheitsstadium abgeleitet werden. Diese Daten weisen darauf hin, dass die α -Synuclein-Antikörper-Homöostase durch das IPS gestört wird und die Antikörper möglicherweise als Biomarker für den Krankheitsverlauf verwendet werden könnten (136).

In der Arbeitsgruppe *Neurologische Therapieforschung* konnte bereits gezeigt werden, dass natürlich vorkommende Antikörper gegen Amyloid β (A β) als Teil des Autoantikörperpools eine physiologische Funktion erfüllen und einen protektiven Effekt durch Inhibierung der Oligomerisierung der A β Peptide und konsequenter Degradierung haben. Diese Antikörper interagieren jedoch nicht mit α -Synuclein (35).

1.3.3 Immunisierungsansätze

Bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wurde die Immunisierung bereits als Therapiestrategie gegen abnorm aggregierte Proteine angewandt.

Durch aktive Immunisierung mit aggregiertem Amyloid β ($A\beta$) in transgenen PDAPP Mäusen (Tiermodell für AD) konnte eine deutliche Amyloid-Plaquereduktion sowie eine Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit nachgewiesen werden (85, 104). Beim Versuch einer aktiven Immunisierung mit der bereits im Mausmodell verwendeten Zubereitung von aggregiertem $A\beta$ in einer klinischen Studie an Alzheimerpatienten entwickelten jedoch 6% der Studienteilnehmer eine subakute Enzephalitis, woraufhin die Studie abgebrochen werden musste. Aus den bis zum Studienabbruch vorhandenen Daten ließ sich allerdings, im Gegensatz zum Mausmodell, kein signifikanter Einfluss auf die kognitive Leistungsfähigkeit aufzeigen (17). Auch durch passive Immunisierung mit gegen $A\beta$ gerichteten Antikörpern konnten ähnliche plaquereduzierende und verhaltensverbessernde Effekte an Mäusen beobachtet werden (17). IVIG bzw. aus IVIG isolierte nAK $A\beta$ konnten *in vitro* die Neurotoxizität von $A\beta$ reduzieren (38, 77). An AD-Patienten wurden bereits mehrere Pilotstudien mit IVIG durchgeführt, die vielversprechende Ergebnisse zeigten (36).

Bezüglich der Immunisierungsansätze zur Therapie des IPS liegen bislang folgende Daten vor: *In vitro* konnte die Bildung von toxischen α -Synuclein Protofibrillen durch die Applikation von Antikörperfragmenten reduziert werden (43).

Ein weiterer Ansatz war die aktive Immunisierung von transgenen α -Synuclein überexprimierenden Mäusen mit humanem α -Synuclein, woraufhin die Tiere hochaffine Antikörper produzierten. Es konnte eine verminderte Akkumulation von α -Synuclein in neuronalen Zellen gezeigt werden, gleichzeitig wurde auch der Zelluntergang vermindert. Außerdem erkannten die Antikörper abnormal aggregiertes humanes α -Synuclein und förderten dessen Abbau. Der genaue Mechanismus hierfür ist jedoch unklar. Die Antikörper könnten membrangebundenes α -Synuclein erkennen, mit diesem Komplexe bilden und über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden, um dort lysosomal degradiert zu werden (78).

Kürzlich präsentierte die gleiche Arbeitsgruppe Ergebnisse eines passiven Immunisierungsversuches mit einem gegen den C-Terminus von α -Synuclein

gerichteten Antikörper in α -Synuclein überexprimierenden Mäusen: Dadurch wurde eine Reduktion der α -Synuclein Aggregate, vor allem im Neuropil, sowie eine Minderung der vorbestehenden Gedächtnisdefizite erzielt. Die genaue Funktion dieser Antikörper ist noch nicht verstanden, aber wie oben beschrieben wird angenommen, dass der C-Terminus eine wichtige Rolle in der α -Synuclein Aggregation spielt und diese durch die Antikörper verhindert werden kann. Durch die Clearance der Aggregate, insbesondere aus dem Neuropil, könnte die synaptische Funktion wieder verbessert werden (79).

1.4 Mikroglia

1.4.1 Vorkommen und Funktion

Mikroglia sind aus dem Knochenmark abstammende Makrophagen, sie sind die immunkompetenten Zellen des ZNS. Dort schwankt ihre Verteilung laut einer Studie an murinen Hirnschnitten zwischen 5% im Corpus callosum und 12% in der Substantia nigra, die damit den höchsten Anteil an Mikroglia im ZNS besitzt. Weitere Regionen mit besonders hohem Mikrogliaanteil sind der Hippocampus, das olfaktorische Telencephalon und die Basalganglien (69).

Werden die normalerweise ruhenden Mikroglia durch Umweltreize wie Verletzungen oder Pathogene aktiviert, ändern sie ihre durch kleine Zellkörper mit dünnen Fortsätzen gekennzeichnete Ruhestuktur in eine amöboide Form. Aktivierte Mikroglia sezernieren zum einen immunmodulatorische Faktoren wie Zytokine, Chemokine, neurotrophe Faktoren sowie Sauerstoff- und Stickoxidradikale. Damit sind sie an der Regulierung der ZNS Homöostase beteiligt. Zum anderen entfernen sie über Phagozytose störende Zellbestandteile und dienen als antigenpräsentierende Zellen. Unter bestimmten Umständen werden sie jedoch überaktiviert und sezernieren dann überschießend proinflammatorische Zytokine, wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, -2 und -6, Stickstoffoxid sowie reaktive Sauerstoffradikale (8, 51, 117).

Auch im Ruhezustand sind Mikroglia hochaktiv und überwachen ihre unmittelbare Umgebung mit mobilen Fortsätzen und einer Vielzahl an Oberflächenrezeptoren für Immunglobuline, Komplementfragmente, Chemokine, Endotoxine und Serumbestandteile. Bei Veränderung des Umgebungsmilieus, wie beispielsweise durch erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke, werden sie

sofort aktiviert (91).

1.4.2 Zytokine: TNF α und IL-6

Zytokine sind niedermolekulare Botenstoffe, die auto- oder parakrin Zellüberleben, -differenzierung und -funktionen regulieren. Klassischerweise werden sie in pro- oder anti-inflammatorische Zytokine unterteilt. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von α -Synuclein auf primäre Mikroglia untersucht. Um dessen mögliche proinflammatorische Wirkung zu beurteilen, wurde dazu die Ausschüttung der Zytokine TNF α und IL-6 untersucht, auf die hier im Weiteren näher eingegangen wird.

Erstmals entdeckt wurde der Tumornekrosefaktor α (TNF α) 1975 als ein endogener nekroseinduzierender Faktor in Sarkomzellen (20). Er kommt im gesamten Körper vor und erfüllt vielfältige Funktionen. Im ZNS wird er sowohl von Neuronen als auch von Astrozyten und Mikroglia produziert.

Nach Verletzungen, Ischämie oder Infektionen im ZNS treten erhöhte TNF α Spiegel auf, je nach Stimulus kann der Spiegel selbst bei kurzer Exposition für lange Zeit erhöht bleiben. TNF α werden sowohl neuroprotektive als auch neurodestruktive Wirkungen, wie die direkte Schädigung von Myelin, zugeschrieben. Diese Effekte scheinen von der Höhe des TNF α -Spiegels abhängig zu sein, wobei hohe Spiegel mit Neurodestruktion einhergehen (51).

Interleukin-6 (IL-6) reguliert besonders Akute-Phase-Reaktionen im Rahmen von Entzündungen. Es ist an der Entstehung von Fieber, Schlaf und Schmerz beteiligt. IL-6 wird vor allem in frühen Phasen von ZNS-Schädigungen von Mikroglia bereitgestellt, es ist einer der Hauptaktivatoren von Mikroglia (51).

1.4.3 Mikroglia im IPS

McGeer *et al.* beschrieben erstmalig 1988 das Vorkommen von aktivierten Mikroglia in der Substantia nigra von Patienten mit IPS und DLB (80). Auf der molekularen Ebene konnte eine erhöhte Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IL-1 β , -2 und -6 im Striatum von IPS Patienten nachgewiesen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass im Tiermodell auf einen Entzündungsreiz spezifisch dopaminerge Neurone in der SN degenerierten. Da in der SN ein

besonders hoher Gehalt an Mikroglia vorliegt, könnten die dopaminergen Neuronen dort bei Inflammationsvorgängen im ZNS besonders viel oxidativem Stress ausgesetzt sein (46). Insbesondere im Hinblick auf die im Abschnitt 1.5.3 beschriebene spezifische Suszeptibilität dieser Region gegenüber oxidativem Stress könnte dies einen wichtigen Einflussfaktor darstellen.

Darüberhinaus wurde gezeigt, dass 7 Tage gealtertes und dabei aggregiertes α -Synuclein primäre mesencephale Mikroglia kulturen aktivierte, durch die dabei hervorgerufene starke proinflammatorische Antwort kam es dann zum Absterben dopaminerg Neurone. Bei diesem Mechanismus schien insbesondere die NADPH Oxidase eine wichtige Rolle zu spielen (138). Auch durch den natürlichen Alterungsprozess scheinen Mikroglia im Sinne einer erhöhten proinflammatorischen Antwort aktiviert zu werden. Dies würde zu der Beobachtung passen, dass eine überschießende Mikrogliaaktivierung bei diversen altersassoziierten neurodegenerativen Erkrankungen zu beobachten ist.

Das Neurotoxin MPTP kann eigenständig nicht zur Mikrogliaaktivierung führen, die Gegenwart von Mikroglia in neuronalen Kulturen potenziert jedoch deren durch MPTP hervorgerufenen Untergang. Dies weist darauf hin, dass Mikroglia zusätzlich durch untergehende Neurone aktiviert werden, und im Gegenzug diese durch überschießende proinflammatorische und oxidative Stressoren erneut schädigen (8).

1.4.4 Neuroinflammation

Die Neuroinflammation ist gekennzeichnet durch eine gleichzeitige Aktivierung von Mikroglia, Astroglia und Lymphozyten. Bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen sind neuroinflammatorische Vorgänge zu beobachten, wie beispielsweise beim Morbus Alzheimer und der Amyotrophen Lateralsklerose. Die von aktivierten Mikroglia sezernierten Zytokine können die Expression der induzierten Stickoxidsynthase (iNOS) sowie der Cyclooxygenase-2 (COX-2) induzieren, diese Enzyme führen zur Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten. Besonders Interferon γ und TNF α sind starke Aktivatoren der iNOS. Durch die Produktion von Stickoxiden wird die Bildung von TNF α durch Astrozyten weiter angeregt. Auch wird spekuliert, dass TNF α über Rezeptoren dopaminerge Neurone direkt stimuliert, die Datenlage dazu ist jedoch bislang noch widersprüchlich (54). Insgesamt kann es durch diesen toxischen Effekt der

überschießenden Inflammationskaskade auf die Umgebung zum Untergang von dopaminergen Neuronen kommen. Durch deren Zelluntergang werden wiederum Mikroglia aktiviert und sezernieren so noch mehr proinflammatorische Zytokine und Radikale. Dies führt zu einem Teufelskreis, der auch als "reaktive Mikrogliose" bezeichnet wird (siehe Abb. 1.9) (8, 54, 117).

Bislang ist allerdings unklar, ob die Neuroinflammation Ursache oder Konsequenz des Degenerationsprozesses darstellt.

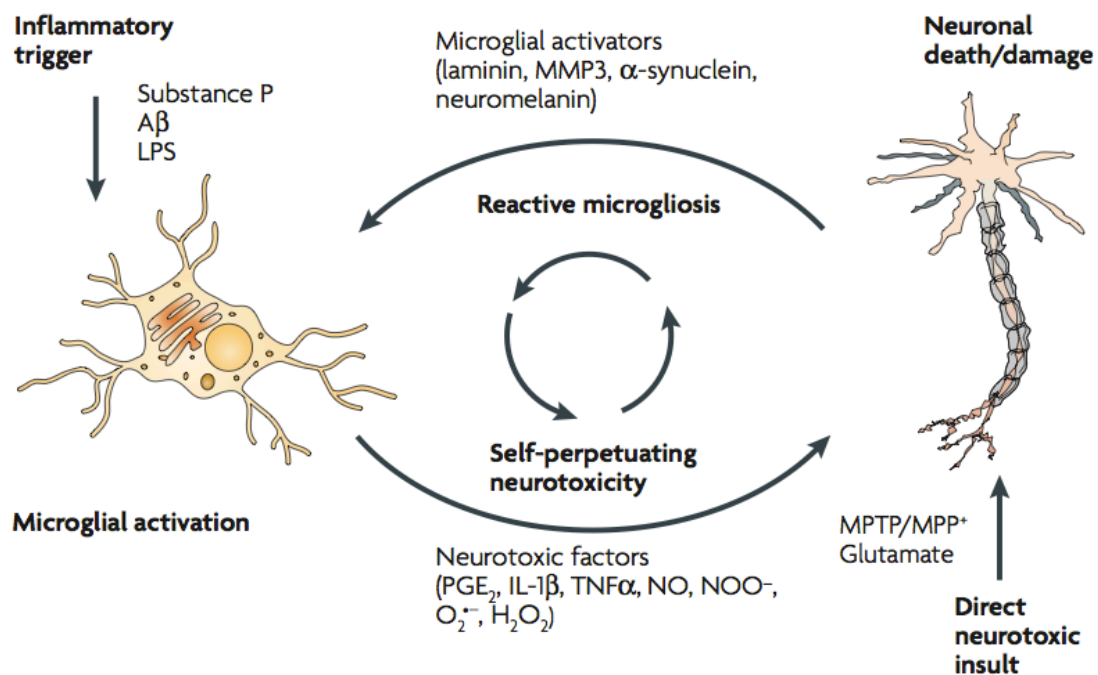


Abb. 1.9 Reaktive Mikrogliose

Mikroglia können über zwei Mechanismen überaktiviert und dann neurotoxisch werden.

1) Direkte Stimulation durch proinflammatorische Stimuli, die zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Sauerstoffradikalen führen und dann Neuronen schädigen.

2) Als Reaktion auf neuronalen Zelluntergang werden Mikroglia aktiviert (reaktive Mikrogliose). Durch die Überaktivierung werden weitere Neurone geschädigt, ein Teufelskreis entsteht.

A β : Amyloid- β ; H₂O₂: Wasserstoffperoxid; IL-1 β : Interleukin 1 β ; LPS: Lipopolysaccharid; MMP3: Matrixmetalloproteinase 3; MPP⁺: 1-Methyl-4-Phenylpyridiniumion; MPTP: 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin; NO: Stickoxid; NOO⁻: Peroxynitrit; O₂⁻: Superoxid; PGE₂: Prostaglandin E₂. Entnommen aus (8).

1.5 Ziele der Arbeit

Natürlich vorkommende Antikörper stellen einen großen Anteil des humanen Antikörperrepertoires dar. Die physiologische Rolle der nAK α -Syn im menschlichen Organismus ist bislang kaum bekannt. Deswegen ist es wichtig, genauere Kenntnis über deren Funktion in der Interaktion mit α -Synuclein zu erlangen.

Die Aggregation und damit einhergehende Toxizität von α -Synuclein ist eine der Hauptkomponenten in der Pathogenese des IPS.

Ziel der Arbeit ist es, folgende Fragestellungen zu beantworten:

- 1) Verändern den einzelnen funktionellen Domänen des Proteins entsprechende α -Synuclein-Fragmente (α -Syn-Fragmente) durch Alterung ihre Sekundärstruktur?
- 2) Welche(s) Epitop(e) werden von den aus IVIG affinitätsaufgereinigten physiologischen nAK α -Syn erkannt und gebunden? Welche funktionellen α -Synuclein-Domänen werden von den nAK α -Syn erkannt und gebunden? Besteht dabei ein unterschiedliches Bindungsverhalten zwischen frischen und gealterten α -Syn-Fragmenten?
- 3) Welche Auswirkung haben extrazellulär hinzugefügte α -Synuclein-Fragmente auf die Zellintegrität und mitochondriale Vitalität von primären murinen kortikalen Neuronen und primären murinen Mikroglia? Falls sich eine zellschädigende Wirkung zeigt, kann diese durch Vorbehandlung mit den nAK α -Syn reduziert werden?
- 4) Können extrazellulär zugegebene α -Syn-Fragmente die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6 auf primären murinen Mikroglia induzieren? Falls dies der Fall ist, besitzen die nAK α -Syn ein anti-inflammatorisches Potenzial und können diese Zytokinausschüttung mindern?

Das Epitope Mapping soll mittels CarboLinkTM- und Sepharose-Säule durchgeführt werden (34, 97). Mit den Antigen-Antikörper-Bindungsassays Dot Blot und ELISA sollen die Bindungseigenschaften der α -Syn-Fragmente genauer untersucht werden. Die Struktur der α -Syn-Fragmente soll in der Gel-Elektrophorese und in der CD-Spektroskopie genauer analysiert werden (10, 41). An primären kortikalen Neuronen und primären Mikroglia sollen mittels LDH- und MTT-Assay Auswirkungen der α -Syn-Fragmente auf Zellintegrität und mitochondriale Vitalität untersucht werden. Sollte sich eine zellschädigende Wirkung der α -

Syn-Fragmente zeigen, soll getestet werden, ob diese durch Vorinkubation der nAK α -Syn mit den α -Syn-Fragmenten vor Zugabe zu den Zellen beeinflusst werden kann (16). Die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6 soll auf mit α -Syn-Fragmenten behandelten primären Mikroglia gemessen werden. Sollten diese proinflammatorischen Zytokine vermehrt ausgeschüttet werden, soll des Weiteren untersucht werden, ob diese durch Vorinkubation der α -Syn-Fragmente mit den nAK α -Syn vermindert werden kann.

Durch genauere Kenntnis der Epitope auf α -Synuclein könnte die Wirkung der nAK α -Syn spezifisch mit Hilfe schneller herzustellender synthetischer Antikörper erzielt werden. Bisher gibt es keine kausale Therapie des IPS. Sollten die nAK α -Syn neuroprotektive oder anti-inflammatorische Wirkung besitzen, könnten sie als krankheitsmodifizierende Therapiestrategien zur Steigerung des Überlebens dopaminerger Neurone oder Abschwächung der reaktiven Mikroglie in Betracht kommen.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

| | |
|------------------------------------|---|
| 1D-SDS PAGE Systeme | Mini PROTEAN TetraCell Bio-Rad |
| Abzug | mc6 Airflow Controller AC2 Waldner |
| Autoklav | Systec |
| Brutschrank 37°C | Binder |
| Eismaschine | Amersham Biosciences |
| ELISA-Washer | Biotrak II Washer 4 Amersham Biosciences |
| ELISA-Reader | Multiscan EX 355 Thermo Electron Corporation |
| Entwicklermaschine | Optimax Typ TR |
| Fluoreszenzmessgerät | Infinite M200 Tecan Dtlid GmbH |
| Heizblock | MKR 13 HLC |
| Kühlschrank -80°C | Grant Instrumental Ltd |
| Kühlschränke 4°C, -20°C | Sanyo |
| Mikroskop | Liebherr |
| Nanodrop | TS100 Nikon Eclipse |
| Pipetten im Bereich 0,1 µL-1000 µL | ND-1000 PEQLab Biotechnologie GmbH |
| Pipetten 5 mL, 10 mL, 25 mL | Eppendorf |
| Pipetboy | Greiner Bio-one |
| pH Meter | Accu Jet [®] pro, Brand |
| Plattformschüttler | MP 220 Mettler Toledo |
| Schüttler | Unimax 1010 Heidolph |
| sterile Werkbank | HLC BioTech |
| Vortex | KS12 Thermo scientific |
| Waagen | VWR international |

| | |
|-------------------|---|
| Wasserbad | Sartorius |
| Überkopfschüttler | PTR-60 Grant-bio |
| Ultraschallbad | Bandelin Sonortex |
| Zentrifugen | - Biofuge stratos, ThermoScientific - 16DH, VWR Galaxy |

2.2 Chemikalien

| | |
|---------------------------------|---------------------|
| Aceton | Acros Organics |
| 30% Acrylamid Stock Solution | Roth |
| APS (Ammoniumpersulfat) | Genaxxon bioscience |
| Albumin human Fraction V | SERVA |
| Brilliant Blau G250 | Roth |
| Bromphenolblau | SERVA |
| BSA (bovines Serumalbumin) | Roth |
| Casein | Sigma |
| DMSO | AppliChem |
| DTT | Genaxxon bioscience |
| Essigsäure 100% | Merck |
| Ethanol absolut | J.T. Baker |
| Formaldehyd 37% | Sigma |
| Glycin | Roth |
| Glycerol 87% | Merck |
| H ₂ SO ₄ | Roth |
| KCl | Roth |
| KH ₂ PO ₄ | Sigma-Aldrich |
| β-Mercaptoethanol | Roth |
| Methanol | Sigma |

| | |
|---|--------------------|
| Milli-Q ddH ₂ O | Eigene Herstellung |
| NaCl | Roth |
| NaHPO ₄ | Sigma-Aldrich |
| NaH ₂ PO ₄ | Sigma-Aldrich |
| NaOAc, wasserfrei | Roth |
| NaOH | Acros Organics |
| Na ₂ CO ₃ | Sigma |
| Na ₂ HPO ₄ | Roth |
| Na ₂ S ₂ O ₃ Pentahydrat | Roth |
| Natriumazid 99% | Sigma-Aldrich |
| Phosphorsäure | Roth |
| Roti [®] Block | Roth |
| Silbernitrat | AppliChem |
| SDS ultra pure | Roth |
| Sodium meta-Periodate | Sigma |
| SuperBlock [®] Blocking Buffer in TBS | Calbiochem |
| Super Signal West Dura Extended Duration Substrate | Calbiochem |
| TEMED | Roth |
| Thiazolyl blue Tetrazolium Bromide Pulver | Sigma Aldrich |
| TMB soluble | Calbiochem |
| Trichloressigsäure | Roth |
| Trifluoreoacetic acid 99% spectrometric grade | Sigma-Aldrich |
| TRIS | Roth |
| Triton X-100 | Sigma |

| | |
|--|-----------|
| TRIS-Hcl (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) | Fluka |
| Tween-20 | AppliChem |

2.3 Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden von den Firmen Eppendorf und Sarstedt bezogen.

| | |
|--|--------------------------|
| CL-Xposure Film Clear blue X-Ray Film | ThermoScientific |
| 96-well Round Bottom Plate | Sarstedt |
| Vivaspin MWCO 10.000 2 mL; 20 mL MWCO 5.000 2 mL | Sartorius Stedim Biotech |
| Filter 0,2 µm | Sarstedt |
| Bottle-Top-Filter 0,2 µm | Sarstedt |
| IWAKI-ELISA Plate | IWAKI Scitech div. |
| PVDF-Membran | Roth |
| Nitrocellulosemembran | Roth |

2.4 Zellkulturmaterialien

| | | |
|---|-------|-------------|
| DPBS w/o Ca ²⁺ and Mg ²⁺ | LONZA | # BE17-512F |
| DMEM mit Phenolrot | LONZA | # BE12-733F |
| Neurobasal A | GIBCO | # 12349 |
| Fetal Bovine Serum | LONZA | # DE14-850F |
| L-Glutamin 200 mM in 0,85% NaCl | LONZA | # BE17-605E |
| Penicillin/Streptomycin 100x | PAA | # P11-010 |

MATERIAL

| | | |
|--------------------------------------|-----------------|-------------|
| B27-Supplement | GIBCO | # 17504-044 |
| Arabinosyl-Cytosin | Sigma | # C1768 |
| Leibovitz's L15-Medium | PAA | # E15-020 |
| Trypsin-Versene (EDTA) 200 mg/L | LONZA | # BE17-161E |
| Zellkulturflasche 75 cm ² | Greiner bio-one | # 658175 |
| 24 Well-Platten Cell Star | Greiner bio-one | # 662160 |

2.5 Puffer

Zum Einstellen des pH-Wertes wurde jeweils HCl-Lösung bzw. NaOH-Lösung verwendet.

Puffer, die nur für bestimmte Methoden eingesetzt wurden, sind unter der Beschreibung der jeweiligen Methode aufgeführt.

10x PBS Lösung (10 L): 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 12 mM

Phosphatpuffer

800 g NaCl, 20 g KCl, 144 g Na₂HPO₄, 24 g KH₂PO₄ in 9 L Milli-Q ddH₂O lösen, pH auf 6,8 einstellen und auf 10 L auffüllen mit Milli-Q ddH₂O.

1x PBS Lösung (immer steril filtriert)

10x PBS Lösung mit Milli-Q ddH₂O verdünnen, steril filtrieren mit 0,2 µm Filter (Sarstedt).

Waschpuffer PBS Tween 0,05%

800 mL Milli-Q ddH₂O und 200 mL 10x PBS steril filtrieren, 1000 µL Tween 20 zugeben.

2.6 Antikörper

Erstantikörper:

| | | |
|---|-----------------------------|------------|
| Anti-human alpha-Synuclein 211 (mouse) | Invitrogen | # AHB0261 |
| α/β/γ-Synuclein (FL-140) Antibody | Santa Cruz Biotechnology | # sc-10717 |

Zweitantikörper:

| | |
|--|--------------------------|
| Anti Mouse IgG HRP-linked Antibody | ThermoScientific # 31430 |
| Anti Human IgG HRP-linked Antibody | ThermoScientific # 31410 |
| Anti Rabbit IgG HRP-linked Antibody | ThermoScientific # 32260 |

2.7 α -Synuclein und α -Synuclein-Fragmente

| | | | |
|---|-------------|----------|-----------|
| α-Synuclein human | 1 mg | rPeptide | # S1001-2 |
| 1-60 | 500 μ g | rPeptide | # S1011-1 |
| 1-95 | 500 μ g | rPeptide | # S1012-1 |
| 61-140 | 500 μ g | rPeptide | # S1013-1 |
| 96-140 | 500 μ g | rPeptide | # S1014-1 |
| NACP 112 (α-Syn 112) | 500 μ g | rPeptide | # S1016-1 |

3. Methoden

3.1 Aufreinigung der natürlich vorkommenden α -Syn-Autoantikörper

3.1.1 α -Synuclein-Affinitätssäule

Als Trägermaterial wurde AminoLink Plus Coupling Resin Gel verwendet. Dieses besteht aus quervernetzter perlschnurförmig angeordneter Agarose, die über freie Aldehydbindungen verfügt. Letztere reagieren spontan mit den primären Amingruppen von Proteinen zu Schiffsbasen. Unter Anwesenheit eines milden Reduktionsmittels, wie dem hier verwendeten Natriumcyanoborhydrid, werden diese zu stabilen sekundären Aminbindungen reduziert. Damit lässt sich ein Protein mit hoher Kopplungseffizienz an das Trägermaterial immobilisieren.

Das gesamte Material wurde, falls nicht anders erwähnt, vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht, sämtliche Puffer wurden entgast:

Coupling Buffer:

0,1 M NaH_2PO_4 , 0,15 M NaCl, pH 7,2

Cyanoborohydride Solution

5 M NaCNBH_3 (AminoLink Reductant, # 44892 PIERCE) in 1 M NaOH

Quenching Buffer:

1 M Tris-HCl, pH 7,4

Wash Solution:

1 M NaCl

Storage Solution

1x PBS, 0,05% Natriumazid

1 mg α -Synuclein wurde in 2 mL Wasser gelöst und zum Umpuffern in einer Vivaspin 2 MWCO 5 kDa bei 12000 x g 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert, anschließend wurde die Vivaspin jeweils 3 x mit 2 mL PBS aufgefüllt und wiederholt bei 12000 x g 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Die Säule wurde nach Angaben des Herstellers PIERCE (Manual #20501 PIERCE Biotechnology) aus Disposable Polypropylene Columns und Porous Discs zusammengebaut und dann mit 4 mL AminoLink Plus Coupling Resin

(PIERCE, # 20501) gefüllt. Anschließend wurde sie mit 6 mL Coupling Buffer equilibriert. Danach wurden 2 mL α -Synuclein-Proteinlösung hinzugefügt und ins Gelbett einlaufen gelassen, gefolgt von 40 μ L Cyanoborohydride Solution. Im Anschluss wurde die Säule über Nacht bei 4°C in den Überkopfschüttler gestellt. Am nächsten Tag wurde nach Abfließen des Überstands mit 4 mL Quenching Buffer gewaschen, dann wurden 2 mL Quenching Buffer und 40 μ L Cyanoborohydride Solution ins Gelbett einlaufen gelassen und die Säule 30 Minuten bei 4°C in den Überkopfschüttler gestellt. Als Nächstes wurde nach Abfließen des Überstands erst mit 10 mL Washing Buffer gewaschen, folgend mit 6 mL Storage Solution. Abschließend wurde die Säule bei 4°C gelagert. Von allen Kopplungs- und Waschschritten wurden Aliquots genommen und per Nanodrop die Konzentration von α -Synuclein bestimmt.

3.1.2 Aufreinigung der α -Synuclein Autoantikörper

Storage Solution

1x PBS, 0,05% Natriumazid

Octagamlösung

11 mL Octagam (Octapharm), 11 mL 1x PBS, steril filtriert durch 0,2 μ m Filter

0,1 M Glycinpuffer

7,507 g Glycin in Milli-Q ddH₂O lösen, auf 1 L auffüllen, mit HCl auf pH 2,8 einstellen

1% (w/v) Natriumazid

1 g Natriumazid in 100 mL Milli-Q ddH₂O lösen

1 M Tris

Die Säule wurde auf Raumtemperatur gebracht, die Storage Solution abgelassen und anschließend mit 50 mL 1x PBS gespült. Danach wurden 3,5 mL Octagamlösung ins Gelbett einlaufen gelassen, anschließend erfolgte 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur, darauffolgend wurde der Überstand abgelassen und aufgesammelt. Dieser Schritt wurde wiederholt bis die Octagamlösung aufgebraucht war. Der aufgesammelte Durchfluss der Octagamlösung (FlowThrough, FT) wurde für die Verwendung als Kontrolle bei den nachfolgenden Versuchen aufbewahrt. Dazu wurde er, sofern nicht für die Zellkultur

bestimmt, mit 0,05% Natriumazid versetzt. Danach wurde die Säule erneut mit 50 mL 1x PBS gespült. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 8 mL Glycinpuffer, der zuvor in 37°C warmem Wasserbad erwärmt wurde. Der Durchfluss wurde sofort in Fraktionen à 500 µL in 1,5 mL LoBind Reaktionsgefäßen gesammelt. Nach der Elution wurde die Säule mit 50 mL 1x PBS gespült, gefolgt von 25 mL Storage Solution. Bedeckt mit letzterer wurde sie dann bei 4°C aufbewahrt.

Die eluierten Fraktionen wurden umgehend mit 1 M Trislösung auf pH 8,0 titriert und zum Lagern mit je 25 µL 1% (w/v) Natriumazid versetzt, resultierend in einer Endkonzentration von 0,05% Natriumazid. Daraufgehend wurden mittels Nanodrop die Fraktionen mit den höchsten IgG-Konzentrationen ausgewählt und bei 4°C aufbewahrt.

Anschließend wurden die Fraktionen aufgereinigt und umgepuffert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in einer 16DH Zentrifuge (VWR Galaxy) bei 8000 x g und 4°C.

Dazu wurde eine Vivaspin 20 mL MWCD 10.000 kDa zur Vorbereitung mit 15 mL 1x PBS gefüllt und 20 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen in die Vivaspin gefüllt und 20 Minuten zentrifugiert. Danach wurde jeweils 3x mit 1x PBS auf 15 mL aufgefüllt und je 20 Minuten zentrifugiert. Die Konzentration des Überstandes wurde mittels Nanodrop bestimmt. Die aufkonzentrierten Autoantikörper wurden als Aliquots bei -20°C gelagert. Bis auf die für die Zellkulturversuche bestimmten Aliquots wurden der Antikörperlösung 0,05% Natriumazid zugegeben.

3.2 Rekombinantes α -Synuclein und α -Synuclein-Fragmente

3.2.1 Lyophilisierte Proteine lösen

Das lyophilisierte α -Synuclein bzw. die α -Syn-Fragmente wurden auf Raumtemperatur gebracht. Danach wurden sie in 500 µL (α -Synuclein) bzw. in 250 µL (α -Syn-Fragmente) Milli-Q ddH₂O gelöst, resultierend in einer Endkonzentration von jeweils 2 mg/mL. Anschließend wurden die Lösungen durch einen 0,2 µM Filter filtriert, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Falls nicht anders angegeben, wird sich bei α -Synuclein-Stock immer auf die hier gewählte Konzentration von 2 mg/mL bezogen.

3.2.2 Lösungen für ELISA und Dot Blot

Frische α -Syn-Fragmente: Die frisch gelösten α -Syn-Fragmente wurden umgehend für die Versuche weiterverwendet.

α -Syn-Fragmente altern lassen: Für die Versuche mit gealterten α -Syn-Fragmenten wurden die 2 mg/mL Stock-Lösungen je 7 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Kontrollen: Als Kontrollen für weitere Versuche im Dot Blot/ELISA wurden bovines Serumalbumin (BSA) und humanes Serumalbumin (HSA) jeweils in Konzentrationen von 2 mg/mL in Milli-Q ddH₂O verdünnt und genauso wie die α -Syn-Fragmente behandelt, also auf -20°C eingefroren oder 7 Tage bei 37°C im Brutschrank altern gelassen. Casein wurde in 0,1 M Natriumazetat gelöst auf eine Konzentration von 2 mg/mL, das weitere Verfahren entsprach dem von BSA/HSA.

3.2.3 Lösungen für die Zellkultur ansetzen

Die frisch angesetzte α -Synuclein-Lösung bzw. α -Syn-Fragment-Lösungen mit der Konzentration 2 mg/mL wurden mit DPBS (LONZA) auf je 100 μ M verdünnt. Dabei ergaben sich ausgehend von den unterschiedlichen molaren Massen der α -Syn-Fragmente folgende Verdünnungsfaktoren:

| α -Syn-Fragment | Verdünnung |
|-------------------------------|------------|
| 1-60 | 1 : 3,25 |
| 1-95 | 1 : 2,13 |
| 61-140 | 1 : 2,36 |
| 96-140 | 1 : 3,83 |
| NACP 112 (α -Syn 112) | 1 : 1,76 |

α -Syn-Fragmente altern lassen: Für die Zellkulturversuche mit gealterten α -Syn-Fragmenten wurden die 100 μ M Stock-Lösungen je 7 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Gleichmaßen wurde mit den 2 mg/mL Stock-Lösungen für ELISA und Dot Blot verfahren.

Für die Zellkultur-Assays wurden die α -Syn-Fragmente in Konzentrationen von 1 μ M und 10 μ M an primärer Mikroglia und primären kortikalen Neuronen getestet. Hierzu wurden bei einem Mediumvolumen von 400 μ L jeweils 4 μ L/well

bzw. 40 µL/well der 100 µM Stocklösung zugegeben. Nach 24 Stunden wurden bei den primären Mikroglia 100 µL Medium/well entnommen und bei -80°C eingefroren, um darin später die Zytokinkonzentration zu bestimmen. Nach 48 Stunden wurden LDH-Assay (bei primären kortikalen Neuronen) und MTT-Assay (alle Zelllinien) durchgeführt.

Für die Autoantikörperversuche wurden je 1 µM α-Syn-Fragment (primäre Mikroglia) bzw. 10 µM α-Syn-Fragment (primäre kortikale Neurone) verwendet. Der natürliche Autoantikörper und der FlowThrough (FT) wurden dabei vor Zugabe zu den Zellen mit den α-Syn-Fragmenten vorinkubiert. Dazu wurden 200 nM nAK α-Syn bzw. FT mit 1 µM α-Syn-Fragment (primäre Mikroglia) oder 700 nM nAK α-Syn bzw. FT mit 10 µM α-Syn-Fragment (primäre kortikale Neurone) in 100 µL frisch aus dem jeweiligen well entnommenen Medium vermischt und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Danach wurden die Lösungen zurück auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden erfolgte bei den primären Mikroglia wie oben beschrieben eine Mediumentnahme für den Zytokin-ELISA, nach 48 Stunden wurde bei beiden Zelllinien ein MTT-Test durchgeführt.

3.3 Gel-Electrophorese und Western Blot

3.3.1 SDS-PAGE

Marker:

| | | |
|-------------------------------|------------|------------|
| Precision Plus Protein | | |
| Standard All Blue | Bio-Rad | # 161-0373 |
| Protein Marker | | |
| SeeBlue Plus 2 | Invitrogen | # LC5925 |

Puffer:

| |
|---|
| 10x Laemmli Buffer |
| 60,5 g Tris, 288 g Glycin und 20 g SDS in 1,8 L Milli-Q ddH ₂ O lösen, dann auf 2 L auffüllen. |
| 1x Running Buffer |
| 100 mL 10x Puffer mit 900 mL Milli-Q ddH ₂ O mischen. |

4x Stacking Gel Puffer (0,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 6,8)

125 mL 1 M Tris, 125 mL Milli-Q ddH₂O mischen, 1 g SDS darin lösen, auf pH 6,8 einstellen.

4x Separation Gel Puffer (1,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 8,8)

1 g SDS in 250 mL 1,5 M Tris lösen, auf pH 8,8 einstellen.

4x Probenpuffer (reduzierend)

(40% Glycerol, 240 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 5% β-Mercaptoethanol)

In Lösung mit 4,6 mL 87% Glycerol, 2,4 mL 1 M Tris-HCl pH 6,8, 0,5 mL β-Mercaptoethanol und 2,5 mL Milli-Q ddH₂O 0,8 g SDS lösen. Eine Spatelspitze Bromophenolblau hinzugeben.

4x Probenpuffer (nicht-reduzierend)

Wie reduzierender Probenpuffer, nur ohne β-Mercaptoethanol.

Separation-Gel 12%

8 mL 30% Acrylamid Stock, 5 mL 4x Separation Gel Buffer, 120 µL 10% APS, 20 µL TEMED, 6,86 mL Milli-Q ddH₂O

Separation-Gel 15%

10 mL 30% Acrylamid stock, 5 mL 4x Separation gel buffer, 120 µL 10% APS, 20µL TEMED, 4,86 mL Milli-Q ddH₂O

Towbin-Blotting-Buffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% Methanol, pH 8,3)

14,4 g Glycin, 3 g Tris, 200 mL Methanol und 600 mL Milli-Q ddH₂O mischen, auf 1L mit Milli-Q ddH₂O auffüllen.

Zum Gießen des Gels wurde ein Cast Stand (Bio-Rad) verwendet. Die fertigen Gele wurden in das Electrophoresis Module (Bio-Rad) eingebaut und mit 1x Running Buffer bedeckt. Die Proben wurden anschließend in die Ladeslots des Stacking-Gels aufgetragen. Dieses dient dem Sammeln der Proben. Im nachfolgenden Separation-Gel wurden die Proben in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht in einzelne Proteinbanden aufgetrennt. Je höher das Molekulargewicht, desto langsamer wandern die Proben im elektrischen Feld, das SDS-Gel fungiert hierbei als eine Art molekulares Sieb. Die dazu jeweils gewählte elektrische Spannung sowie Laufdauer ist bei der Beschreibung der einzelnen Versuche angegeben.

Mittels einer ebenfalls aufgetragenen standardisierten Marker-Proteinmischung

kann somit auf die Molekulargröße der eingesetzten Proben rückgeschlossen werden. Die Proteinbanden können durch verschiedene Färbemethoden (siehe unten) erkennbar gemacht werden.

Auch durch hohe Azidität der aufgetragenen Proteine wird die Laufgeschwindigkeit im elektrischen Feld verlangsamt, so findet sich für das 14,5 kDa große α -Synuclein eine Bande im Bereich von 19 kDa. Dies liegt daran, dass die ungefaltete C-terminale Domäne viele saure Aminosäuren enthält, wodurch die Bindung an SDS abgeschwächt wird (3).

3.3.2 Western Blot

Im Western Blot werden die per Gel-Electrophorese molekulargewichtsabhängig aufgetrennten Proteinbanden durch ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld auf eine Membran übertragen. Diese wird anschließend mit einem Erstantikörper sowie einem Zweitantikörper inkubiert. Durch dieses zweizeitige Verfahren wird eine Signalverstärkung erzielt. Schließlich werden mit einer Fluoreszenzlösung, die an die Proteinbanden auf der Membran gebundenen Antikörper detektiert und durch Belichtung und Entwicklung eines Films dargestellt. Dadurch können spezifisch bestimmte Proteine dargestellt werden. Verwendet wurde ein Tank-Blot-Modul (XCell II. Blot Module, Invitrogen) sowie eine 30 Sekunden in Methanol aktivierte PVDF-Membran. Die einzelnen Bestandteile wurden in folgender Reihenfolge blasenfrei in der Transferkassette aufeinandergelegt: Schwämme, Filterpapier (Whatman), Gel, PVDF-Membran, Filterpapier, Schwämme. Die Membran befand sich dabei auf der Seite der Anode und das Gel auf der Seite der Kathode. Anschließend wurde die Membran mit 1x Rotiblock für 1 Stunde auf dem Schüttler zur Blockade freier Bindungsstellen inkubiert und als Nächstes 3x 10 Minuten mit 1x PBS + 0,05% Tween gewaschen (die Waschzeiten und -lösung gelten auch für alle folgenden Waschschrte). Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C und mit nachfolgendem Waschen. Die Inkubation des Zweitantikörpers erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit anschließendem Waschen. Zuletzt wurde die Membran mit SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Verwendung nach Angaben des Herstellers ThermoScientific) inkubiert, und danach die Filme belichtet und entwickelt.

3.4 Proteinnachweis auf SDS-Gelen

3.4.1 Coomassie-Färbung

Coomassie-Stocklösung

500 mL Milli-Q ddH₂O, 30 mL O-Phosphorsäure, 100 g Ammoniumpersulfat, 1 g Brilliant Blau mischen, mit Milli-Q ddH₂O auf 1 L auffüllen.

Färbelösung

Stocklösung mit Methanol verdünnen: 80 mL Stocklösung, 20 mL Methanol

Entfärbelösung

80 mL Milli-Q ddH₂O, 20 mL Methanol

Zum Färben wurde das Gel über Nacht in Färbelösung auf dem Schüttler inkubiert, diese wurde anschließend abgeschüttet und das gefärbte Gel mehrere Stunden lang in der Entfärbelösung geschüttelt.

3.4.2 Silberfärbung

Fixing Solution

30 mL Methanol, 10 mL Essigsäure, mit Milli-Q ddH₂O auf 100 mL auffüllen.

NaAcetat Stock 1N

8,203 g NaAcetat in 80 mL Milli-Q ddH₂O lösen, pH einstellen, mit Milli-Q ddH₂O auf 100 mL auffüllen.

Sensitizer

(0,2% (w/v) Na₂S₂O₃ x 5H₂O, 0,1 N NaAcetat pH 6,0, 30% Ethanol)

0,2 g Na₂S₂O₃ x 5H₂O, 10 mL 0,1 N NaAcetat pH 6,0, 30 mL Ethanol, mit Milli-Q ddH₂O auf 100 mL auffüllen.

Stain

(0,1% (w/v) Silbernitrat, 0,009% (v/v) 37% Formaldehyd)

0,2 g Silbernitrat, 0,025 mL 37% Formaldehyd, mit Milli-Q ddH₂O auf 100 mL auffüllen, auf Eis stellen bis zum Gebrauch.

Developer

(2,5 % (w/v) Na₂CO₃), 0,018% (v/v) 37% Formaldehyd)

6 g Na₂CO₃, 0,05 mL 37% Formaldehyd, Milli-Q ddH₂O zugeben bis auf 100 mL.

Stop Solution 6 mL 100% Essigsäure

Alle Gebrauchslösungen (bis auf den NaAcetat Stock) wurden jeweils frisch angesetzt.

Nach dem Lösen aus dem Casting Stand wurde das Gel in eine mit Milli-Q ddH₂O gefüllte Silberfärbungskassette gegeben. Zum Fixieren wurde Milli-Q ddH₂O abgeschüttet, durch 100 mL Fixing Solution ersetzt und für 15 Minuten geschüttelt. Dieser Fixierschritt wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde die Fixing Solution durch 100 mL Sensitizer ersetzt, in diesem wurde sie über Nacht geschüttelt. Ab diesem Schritt wurde die Silberfärbungskassette mit Aluminiumfolie abgedeckt. Am nächsten Tag wurde der Sensitizer abgegossen und für fünfmal 5 Minuten in Milli-Q ddH₂O geschüttelt. Danach erfolgte die Zugabe von 100 mL Stain, dieser wurde 25 Minuten geschüttelt. Schließlich wurde eine Minute lang mit Milli-Q ddH₂O gewaschen und danach 100 mL Developer zugegeben bis Proteinbanden sichtbar wurden. Der Developer wurde dann abgeschüttet und durch 100 mL frischen Developer ersetzt. Nachdem die Proteinbanden gefärbt waren, wurde die Reaktion durch Zugabe der Stop Solution abgestoppt. Nach 5 Minuten Inkubation wurde noch dreimal 10 Minuten mit Milli-Q ddH₂O gewaschen.

3.5 Immunpräzipitation

Probenpuffer

100 µL 4x NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen), 3000 µL Milli-Q ddH₂O,
44,4 µL DTT

In der Immunpräzipitation werden an Trägermaterial (hier Protein G) gebundene Antikörper mit einer Antigenlösung inkubiert. Somit binden die Antikörper die Antigene aus einer Lösung heraus, was den physiologischen Bindungen näher kommt als andere Verfahren zum Antigen-Antikörper-Bindungsnachweis. Gebundene Antigene werden mittels Gel-Electrophorese und Western Blot dargestellt.

Zuerst wurde die Protein-G-Matrix (# 53126 PIERCE) blockiert: Dazu wurden 1000 µL Matrix in ein 2 mL LoBind-Reaktionsgefäß gegeben und sedimentieren gelassen, der Überstand wurde abpipettiert. Danach wurde viermal mit 1x PBS gewaschen, dazu wurde jeweils bei 13000 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert und anschließend der Überstand abpipettiert. Unter den gleichen Zentrifugationsein-

stellungen wurde einmal mit 1x Rotiblock gewaschen. Dann wurde das Reaktionsgefäß mit 1x Rotiblock aufgefüllt und über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde, nachdem das Reaktionsgefäß mit der Protein G Matrix Raumtemperatur erlangt hatte, zweimal mit 1x Rotiblock gewaschen (4 Minuten bei 13000 rpm) und das Reaktionsgefäß anschließend mit 1x Rotiblock auf 1000 µL aufgefüllt. Danach erfolgte die Probenvorbereitung: pro Probe wurden 100 µL blockierte Protein G Matrix, 300 ng α-Synuclein und 10 µg des jeweiligen Autoantikörpers in ein 2 mL LoBind-Reaktionsgefäß gegeben, dies wurde dann mit 1x Rotiblock auf 1 mL aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte wieder über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler. Am nächsten Tag wurden die Proben nach Erlangen der Raumtemperatur fünfmal mit 1x PBS gewaschen (5 Minuten bei 10.000rpm), anschließend wurden zu jeder Probe 24 µL Probenpuffer hinzugegeben. Die Proben wurden bei 95°C 10 Minuten lang denaturiert und direkt danach 5 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden für die Gel-Electrophorese verwendet. Es wurde ein selbstgegossenes 12% SDS-Gel genommen, die Proben liefen bei 60 V ins Separation Gel ein, danach bei 140 V bis zum Ende des Gels. Der Western Blot erfolgte auf einer PVDF-Membran, geblottet wurde 40 Minuten bei 160 mA. Die Inkubation der Membran erfolgte mit dem Erstantikörper Anti-human alpha-Synuclein 211 mouse (Invitrogen) in der Verdünnung 1: 20.000 und anschließend dem Zweitantikörper Anti Mouse IgG HRP-linked Antibody (ThermoScientific) in der Verdünnung 1: 50.000.

3.6 Epitope Mapping Säulen

3.6.1 CarboLink™ Säule

Analog zu den Bindungsbedingungen der Immunpräzipitation werden zuerst Autoantikörper an das Trägermaterial (hier CarboLink™ Coupling Gel) gebunden und diese anschließend mit einer Antigenlösung inkubiert (nach PIERCE CarboLink™ Coupling Gel Instructions (# 20391)).

Alle Puffer wurden entgast. Alle verwendeten Materialien wurden stets vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt.

Coupling Buffer0,1 M NaH₂PO₄, pH 7,0

Zuerst wurden die Antikörper für die Kopplung vorbereitet: 150 µg nAK α -Syn/100 µg mAK α -Syn (Anti-human alpha-Synuclein 211 mouse, Invitrogen) wurden mit Coupling Buffer (CB) auf ein Endvolumen von 1 mL verdünnt. Anschließend wurde die Lösung mit 5 mg Sodium meta-Periodate vermischt und 45 Minuten im Dunkeln inkubiert. Währenddessen wurde die Desalting Column (PIERCE, # 43230) mit 15 mL CB gespült. Dann wurde die oxidierte Probe auf die Desalting Column gegeben und ins Gelbett einlaufen gelassen. Gleich danach wurden 0,5 mL CB zugegeben und ebenfalls einlaufen gelassen. Als Nächstes erfolgte die Elution mit 3 x 2 mL CB. Es wurden 3 Fraktionen à 2 mL aufgesammelt und im Nanodrop bei 280 nm die IgG-Konzentration bestimmt. Nur die erste Fraktion wies eine hohe IgG-Konzentration auf und wurde weiterverwendet. In einer Vivaspin 2 mL MWCD 10.000 wurde das Volumen der ersten Fraktion auf 300 µL eingengt. Die Desalting Column wurde danach mit 15 mL CB gespült und wieder bei 4°C gelagert.

Danach wurde das CarboLink Coupling Gel vorbereitet: Die Compact Reaction Column (CRC; USB # 139281) wurde zusammengebaut und mit 300 µL CarboLink Coupling Gel und 150 µL CB gefüllt. Nach 15 Minuten Absetzen lassen wurde mit 750 µL CB gewaschen. Dann wurde das Gelbett mit 450 µL CB in Lösung gebracht und in ein 2 mL LoBind-Eppendorf-Gefäß gegeben, mit der eingengten ersten Fraktion vermischt und über Nacht bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurde die Lösung zurück in die CRC gegeben und für 15 Minuten absetzen gelassen. Der Flüssigkeitsüberstand wurde abtropfen gelassen, der Durchfluss gesammelt und zur Bestimmung der Kopplungseffizienz im Nanodrop gemessen. Darauffolgend wurde dreimal mit je 150 µL CB waschen, der resultierende Durchfluss gesammelt und ebenfalls gemessen. Anschließend wurde mit 1500 µL 1 M NaCl gewaschen. Vor der Kopplung mit α -Synuclein wurde die CRC mit CB gespült, dann wurde das Gelbett mit 300 µL CB in Lösung gebracht und erneut in ein 2 mL LoBind-Eppendorf-Gefäß gegeben, dort mit 50 µL α -Syn-Stock vermischt und über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung wieder in die CRC gegeben, abtropfen gelassen und der Durchfluss für

die Konzentrationsbestimmung im Mikro-BCA-Kit gesammelt. Es wurde fünfmal mit je 150 µL 1x PBS gespült, jeder Durchfluss wurde separat für die weitere Bestimmung im Mikro-BCA-Kit gesammelt.

Zum Bindungsnachweis wurde ein 12% SDS-Gel gegossen. Das Gelbett wurde mit PBS 1 : 1 in Lösung gebracht, daraus wurden 20 µL entnommen, mit 20 µL reduzierendem Probenpuffer versetzt, 10 Minuten bei 95°C denaturiert, als Nächstes wurde der Überstand aufgetragen. Die Proben wurden bei 90 V ins Separation Gel einlaufen gelassen, dann liefen sie im Separation Gel bei 130 V weiter. Anschließend erfolgte eine Darstellung der Proteine mittels Silberfärbung.

Mikro-BCA-Kit

Dieser Kit dient dem quantitativen Nachweis von Proteinen. Es wurde nach Angaben des Herstellers ThermoScientific/Pierce Biotechnology verfahren (# 23235). Da der direkte Durchfluss in CB gelöst war, die Waschdurchflüsse jedoch in 1x PBS, wurden sie auf 2 verschiedenen Platten (96-well Round Bottom Plate, Sarstedt) getestet.

3.6.2 Sepharosesäule

Hier wurde das gleiche Prinzip wie bei der CarboLink™-Säule angewendet, allerdings mit Sepharose als Trägermaterial.

Das Protokoll wurde angepasst an das US-Patent "Diagnosis and Treatment of Alzheimer's and other neurodementing Diseases" zur Durchführung des Epitope Mapping für Aβ und seine natürlich vorkommenden Antikörper (34).

Alle Puffer wurden entgast. Alle verwendeten Materialien wurden stets vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt.

Coupling Buffer

(0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3)

Blocking Buffer

(0,1 M Ethanolamin (Roth), 0,5 M NaCl)

Washing Buffer

(0,2 M NaOAc, 0,5 M NaCl)

Zuerst wurden zur Immobilisierung der nAKs 100 µg nAK α -Syn mit Coupling Buffer auf 500 µL aufgefüllt. 665 mL N-Hydroxysuccinimidyl-activated Sepharose (# H8280 Sigma-Aldrich) wurden in ein LoBind Reaktionsgefäß gegeben, mit sechsmal 1 mL kalter 1 mM HCl gewaschen (jeweils 2 Minuten bei 50 x g zentrifugiert, die Überstände wurden danach jeweils abpipettiert). Dann wurden die gelösten nAK α -Syn zugegeben und 4 Stunden bei Raumtemperatur (RT) im Überkopfschüttler binden gelassen.

Als Nächstes wurde die Lösung in eine CRC gegeben und fünfmal mit 3 mL Blocking Buffer gewaschen, zwischen den Blockierschritten wurde mit 3 mL Washing Buffer gewaschen, beides bei einer Geschwindigkeit von 1 Tropfen pro Sekunde. Anschließend wurde für 1 Stunde in 1 mL Blocking Buffer inkubiert im Überkopfschüttler bei RT. Darauf folgten 7 Waschschrte, alternierend mit 3 mL Washing Buffer bzw. 3 mL Blocking Buffer. Als Letztes wurde mit 10 mL 1x PBS gewaschen. Zur Kopplung von α -Syn wurden 50 µL α -Syn-Stock in 50 µL PBS gelöst. Das Gelbett wurde mit 400 µL PBS gelöst und in eine Glaskapillare gegeben, die α -Syn-Lösung wurde zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf einer Schüttelplatte. Am nächsten Tag wurde die Lösung in eine CRC gegeben, erst mit 5 mL PBS gewaschen, dann mit 5 mL Milli-Q ddH₂O. Für den Bindungsnachweis im SDS-Gel wurden 20 µL Säulenmaterial entnommen, mit 20 µL reduzierendem Probenpuffer versetzt, 10 Minuten bei 95°C denaturiert, anschließend wurde der Überstand aufgetragen. Die Proben wurden bei 90 V ins Separation Gel einlaufen gelassen und liefen danach bei 130 V weiter. Als Nächstes erfolgte eine Darstellung der Proteine mittels Silberfärbung.

Zur Elution von α -Syn wurden 250 µL 0,1% TFA-Lösung ins Gelbett einlaufen gelassen, 15 Minuten bei leichtem Schütteln inkubiert und dann austropfen gelassen. Dieser Schritt wurde noch viermal wiederholt.

TCA-Ausfällung

Durch die TCA-Ausfällung können Proteine aus einer Lösung aufkonzentriert werden.

Die Proben wurden je 1 : 1 mit 20%iger TCA-Lösung verdünnt, durchgemischt und über Nacht bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden sie 20 Minuten bei 13.000 rpm bei 4°C zentrifugiert, dann wurde der Überstand dekantiert. Anschließend wurden je Probe 1 mL eiskaltes Aceton zugegeben, 30 Minuten

bei -20°C inkubiert, nach dem Auftauen 20 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand wieder dekantiert. Dieser Schritt wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Danach wurden die Proben 20 Minuten trocknen gelassen und dann mit je 30 µL 1x reduzierendem Probenpuffer versetzt, 10 Minuten bei 95°C reduziert, auf Eis gekühlt und kurz abzentrifugiert. Die Überstände wurden auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen, bei 90 V ins Separation Gel einlaufen und dann bei 130 V weiterlaufen gelassen. Es erfolgte eine Coomassie-Färbung.

3.7 ELISA

2N H₂SO₄-Lösung

5 mL H₂SO₄, 95 mL Milli-Q ddH₂O

3.7.1 α-Synuclein-ELISA

Well Coating Buffer

209 mg NaH₂PO₄, 13,9 g Na₂HPO₄, 0,5 g Natriumazid in 800 mL Milli-Q ddH₂O lösen, pH 7,6 einstellen, auf 1 L auffüllen mit Milli-Q ddH₂O, bei 4°C lagern.

0,9% NaCl

9 g NaCl in 1 L Milli-Q ddH₂O lösen.

Es handelt sich um einen indirekten ELISA. Dabei soll untersucht werden, ob ein auf die ELISA-Platte gecoatetes Antigen von einem Antikörper erkannt wird. Dieser Antikörper wird wiederum durch einen fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper detektiert und somit die Bindung des ersten Antikörpers an das Antigen indirekt sichtbar gemacht.

α-Syn bzw. -Fragmente wurden auf jeweils 1 µg/mL in Well Coating Buffer verdünnt. Die Round-Bottom Mikrotiterplatte (IWAKIbrand Scitech) wurde mit je 100 µL α-Syn-Lösung/-Fragment-Lösung gefüllt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde sie dreimal im Plate Washer mit PBS/0,05% Tween gewaschen, anschließend mit 300 µL SuperBlock® Blocking Buffer blockiert und erneut über Nacht bei 4°C gelagert. Vor Zugabe der Proben erfolgte dreimaliges Waschen.

Die Proben wurden vor dem Auftragen in 0,9%iger NaCl-Lösung auf die gewünschte Ausgangskonzentration verdünnt. Um 1 : 1 Verdünnungsreihen auf der Platte zu erstellen, wurde jeweils in die wells der Verdünnungsreihe (bis auf dasjenige mit der Ausgangskonzentration) 100 µL 0,9%iger NaCl-Lösung vorgelegt. Anschließend wurden 200 µL der angesetzten Verdünnung in das well mit der A Ausgangskonzentration gegeben. Daraus wurden dann 100 µL entnommen, in das nächste well gegeben, durchmischt, und wieder 100 µL entnommen und ins nächste well pipettiert bis zum Ende der Verdünnungsreihe.

Als Nächstes wurde je 100 µL Probe zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte dreimaliges Waschen, schließlich wurden je 100 µL Peroxidase labeled goat-anti human Antibody 1: 3000 in SuperBlock® Blocking Buffer (# 4014559 Calbiochem) verdünnt zugegeben und erneut eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Darauffolgend wurde sechsmal gewaschen, 100 µL TMB zugegeben und die Platte 15 Minuten im Dunklen inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µL 2N H₂SO₄ gestoppt und die Absorption bei 450 nm im Thermo Multiscan gemessen.

3.7.2 Zytokin-ELISA

| | | |
|--|-------------|----------|
| TNF α DuoSet ELISA Development System | R&D Systems | # DY410 |
| IL-6 DuoSet ELISA Development System | R&D Systems | # DY406 |
| Reagent Diluent Concentrate 2 (10x) | R&D Systems | # 841380 |

Hierbei handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Dabei soll nachgewiesen werden, ob ein Antigen an einen auf die ELISA-Platte gecoateten Antikörper gebunden wird. Das Antigen wird dann von einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper detektiert, es befindet sich also zwischen zwei Antikörpern.

Es wurden, wie vom Hersteller angegeben, Round Bottom Mikrotiterplatten (IWAKIbrand Scitech) verwendet. Abweichend von der Herstellervorschrift wurde zum Blockieren SuperBlock® Blocking Buffer (Calbiochem) verwendet, sowie als Farbsubstrat 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Die Proben wurden

unverdünnt aufgetragen (TNF α) bzw. bis auf die Kontrollen 1 : 7,5fach verdünnt (IL-6).

3.8 Zellkultur

PEI-Lösung

14,4 g BORAX (# B9876 Sigma Aldrich) in 700-800 mL sterilem Wasser lösen, pH 8,3 einstellen, auf 1000 mL auffüllen. Unter ständigem Rühren 4 g PEI (Polyethylenimin 50% w/v, # P-3143 Sigma Aldrich) zufügen. Nach 30 Minuten Rühren steril filtrieren, bei 4°C lagern und kurz vor der Verwendung erneut steril filtrieren.

Sämtliche Versuche wurden an einer sterilen Bench unter Verwendung steriler Verbrauchsmaterialien durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Zellkulturbrutschrank bei 37°C mit 5% CO₂-Luftanteil inkubiert.

Die primären murinen Zellen wurden aus trächtigen Swiss Webster (CFW®) Mäusen (Embryonaltag 13,5) gewonnen. Dabei wurde das Mesencephalon für die Gewinnung der Mikrogliakultur verwendet und der Kortex für die neuronale Kultur. Zur Vorbereitung wurden 24-well-Platten für 24 Stunden mit 500 μ L PEI (Polyethylenimin)-Lösung beschichtet und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am Präparationstag wurden die Platten dann viermal mit sterilem 1x PBS gewaschen und anschließend mit 400 μ L des benötigten Mediums gefüllt.

3.8.1 Präparation der Mikroglia

Die trächtigen Mäuse wurden per Genickbruch getötet, die Embryonen freipräpariert und in L15-Medium gelagert. Jeweils 8-12 isolierte Mesencephala wurden in 1,5 mL L15-Medium gegeben. Durch 25malige Aspiration mit einer Pipette wurde daraus eine homogene Lösung erstellt. Die Lösung wurde mit L15-Medium auf 7 mL aufgefüllt und 5-10 Minuten stehen gelassen, damit größere Zellklumpen sedimentieren konnten. Die Überstände wurden gesammelt und 3-5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Das so erzeugte Zellpellet wurde in einem geeigneten Volumen L15-Medium wieder in Lösung gebracht. Die Zellen wurden auf die vorbereiteten Platten verteilt und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach 48 Stunden wurden 350 μ L der 500 μ L Medium pro well durch

frisches Medium ersetzt. Anschließend wurde alle drei Tage, bzw. bei Eintreten einer Farbindikatorveränderung, das Medium gewechselt. Durch die lange Kultivierung von 14 Tagen und den durchgeführten Mediumwechsel wurde ein selektives Wachstum von Mikroglia und Astrozyten begünstigt. Nach 14 Tagen wurden die Astrozyten aus der Kultur entfernt. Dafür wurden die Zellen einmal mit DMEM ohne FCS gewaschen und anschließend mit DMEM ohne FCS mit 0,06% Trypsin im Brutschrank inkubiert, bis sich die Astrozyten langsam abgelöst hatten. Die abgelösten Astrozyten wurden mit dem Trypsinmedium abpipettiert, zu den übrig gebliebenen Mikroglia wurde dann DMEM mit 10% FCS zugegeben und homogen auf die wells verteilt. Danach wurden die Zellen noch 2-7 Tage ohne Mediumwechsel ruhen gelassen.

3.8.2 Präparation der neuronalen Zellen

Diese entsprach größtenteils der Präparation der Mikroglia. Die gewonnene kortikale neuronale Kultur wurde für 5-7 Tage ohne Mediumwechsel in Neurobasal A-Medium mit B27-Supplement, 1% Penicillin/Streptomycin, ohne Phenolrot inkubiert und dann direkt im Versuch eingesetzt. Somit ergab sich eine Mischkultur, die zu einem etwa 5%igen Anteil auch Mikroglia und Astrozyten enthielt.

3.9 Zytotoxizitäts-Assays

3.9.1 LDH-Assay

Im LDH-Test können Veränderungen der Zellmembranintegrität nachgewiesen werden, womit er zur Untersuchung der damit verbundenen Zellmortalität geeignet ist. Anhand der enzymatischen Quantifizierung der Lactatdehydrogenase (LDH), die bei Zerstörung der Zytoplasmamembran aus der Zelle freigesetzt wird, kann durch die photometrische Messung der LDH-Aktivität auf das Ausmaß des Zelluntergangs geschlossen werden.

Um die maximal mögliche LDH-Ausschüttung zu bestimmen, wurden die Zellen in einem Teil der unbehandelten wells vor der LDH-Bestimmung mit 1%igem Triton lysiert. Für die photometrische Messung wurden 50 µL Medium in einer 96-well-Mikrotiterplatte (Sarstedt) mit 50 µL Milli-Q ddH₂O verdünnt und mit 50 µL der Testlösung aus dem Kit (Cytotoxicity Detection Kit (LDH) # 11644793001

Roche Applied Science) gemischt. Nach 15 Minuten wurde die Absorption bei 490 nm gegen die Referenzwellenlänge von 750 nm gemessen.

3.9.2 MTT-Assay

Im Gegensatz zum LDH-Test misst der MTT-Test die Zellvitalität über den Nachweis mitochondrialer Reduktionsäquivalente und ist damit ein Maß für die mitochondriale Integrität. Gemessen wird photometrisch der Umsatz der Reduktionsäquivalente. Je höher dieser ist, desto vitaler ist die Zelle.

Als Stocklösung wurden 5 mg/mL MTT-Pulver (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide Pulver) in PBS gelöst. Für den Test wurde die MTT-Stocklösung im Zellkulturmedium im Verhältnis 1 : 10 (500 µg/mL) auf die Zellen gegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von DMSO lysiert und nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur die Absorption bei 570 nm gegen die Referenzwellenlänge von 750 nm gemessen.

3.10 Dot Blot

Im Dot Blot werden auf eine Membran aufgetragenen Antigene in einer Antikörperlösung inkubiert und dabei gebundene Antikörper danach mit einer Fluoreszenzlösung markiert und durch Belichten und Entwickeln eines Films dargestellt. Dieses entspricht dem Vorgehen beim Western Blot, nur dass im Gegensatz zu diesem die Antigene im Dot Blot direkt auf die Membran aufgetragen werden.

Die Nitrozellulosemembran wurde mit Bleistift in Quadrate unterteilt. Die Proben wurden in Dots à 5 µL aufgetragen und 15 Minuten lang trocknen gelassen. Um Verdünnungsreihen mit den Mengen 5 µg - 2,5 µg - 1,25 µg - 0,6 µg - 0,3 µg - 0,15 µg zu erhalten wurden die Stocklösungen (alle mit der Konzentration 2 mg/mL) initial 1 : 1 in PBS verdünnt, nach Entnahme der für den Dot erforderlichen Menge erfolgten weitere 1 : 1 Verdünnungsschritte in PBS. Alle folgenden Inkubationschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt: Die Membran wurde zuerst 1 Stunde in 1x Rotiblock blockiert, anschließend mit dem Erstantikörper (in 1x Rotiblock) eine Stunde lang geschüttelt, viermal 5 Minuten lang mit PBS/Tween 0,05% gewaschen und dann mit dem Zweitantikörper (in 1x Rotiblock) für eine Stunde geschüttelt. Danach wurde wiederholt viermal 5 Mi-

nuten mit PBS/Tween 0,05% gewaschen. Als Letztes wurde mit dem Super Signal West Dura Kit nach Herstellerangaben inkubiert und die Membran entwickelt.

| Erstanti- körper | Verdünnung | Zweitantikörper | Verdünnung |
|--|-------------------|---------------------------------------|-------------------|
| nAK | 1 : 1.000 | Anti Human IgG | 1 : 100.000 |
| FT | 1 : 1.000 | HRP-linked Antibody | |
| Anti-human α -Synuclein 211 | 1 : 20.000 | Anti Mouse IgG HRP-linked Antibody | 1 : 50.000 |

Um eine bereits mit einem Antikörper inkubierte Dot Blot Membran ein zweites Mal mit einem anderem Antikörper zu färben, wurden die gebundenen Antikörper durch 5-20-minütiges Waschen in 0,2 M NaOH entfernt und die Membran nach erneutem Waschen (dreimal 10 Minuten 1x PBS + 0,05% Tween) wieder geblockt und wie beschrieben mit den neuen Antikörpern inkubiert.

3.11 Statistische Analyse

Aus den einzelnen Messwerten wurden Mittelwerte \pm Standardabweichung berechnet. Die statistische Analyse wurde mit dem Programm "R" durchgeführt. Dazu wurde zunächst mit dem Levene-Test die Varianzhomogenität untersucht und mit dem Shapiro-Wilk-Test die Normalverteilung. Bei nicht erfüllter Normalverteilung wurde, falls die Varianzhomogenität trotzdem gegeben war, zusätzlich der Kruskal-Wallis-Test berechnet, um auf die Unterschiedlichkeit der Mittelwerte zu testen. Die grafische Verteilung der Proben wurde zudem mit Box Plots dargestellt. Außerdem wurde der *t*-Test für gepaarte Stichproben berechnet. Da die einzelnen Tests keine großen Signifikanz-Unterschiede aufzeigten, werden im Weiteren vereinfacht nur die Ergebnisse des *t*-Tests angegeben. Als statistisch signifikant wurde dabei $p < 0,05$ festgelegt. Die genaue Einteilung der einzelnen Signifikanzniveaus ist jeweils der Legende der einzelnen Grafiken zu entnehmen.

4. Ergebnisse

4.1 Autoantikörperaufreinigung und Bindungsüberprüfung

4.1.1 Affinitätsaufreinigung der nAK α -Syn

Aus humanen intravenösen Immunglobulinen (IVIG) wurden natürliche Autoantikörper gegen α -Synuclein (nAK α -Syn) über eine mit rekombinatem α -Synuclein gekoppelte Affinitätssäule aufgereinigt (Abb. 4.2). Die erhaltenen Autoantikörperfraktionen mit dem höchsten IgG-Gehalt (Abb. 4.1) wurden anschließend gepoolt und aufkonzentriert.

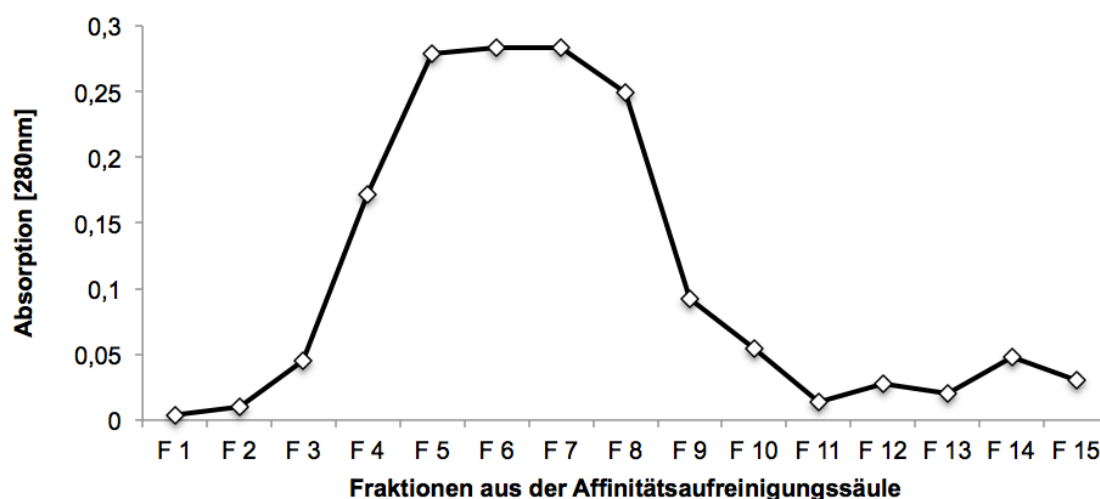


Abb. 4.1 IgG-Gehalt in den Elutionsfraktionen der α -Syn-Affinitätssäule
(Repräsentative Darstellung)

Die nAK α -Syn wurden durch Glycinpuffer von der α -Synuclein-Affinitätssäule gelöst und in Fraktionen aufgesammelt. Der IgG-Gehalt der einzelnen Fraktionen (F1-F15) wurde bei 280nm bestimmt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Hauptfraktionen im Vergleich zu den peripheren Fraktionen eine erheblich höhere Bindungsaffinität an α -Synuclein im ELISA besitzen (4).

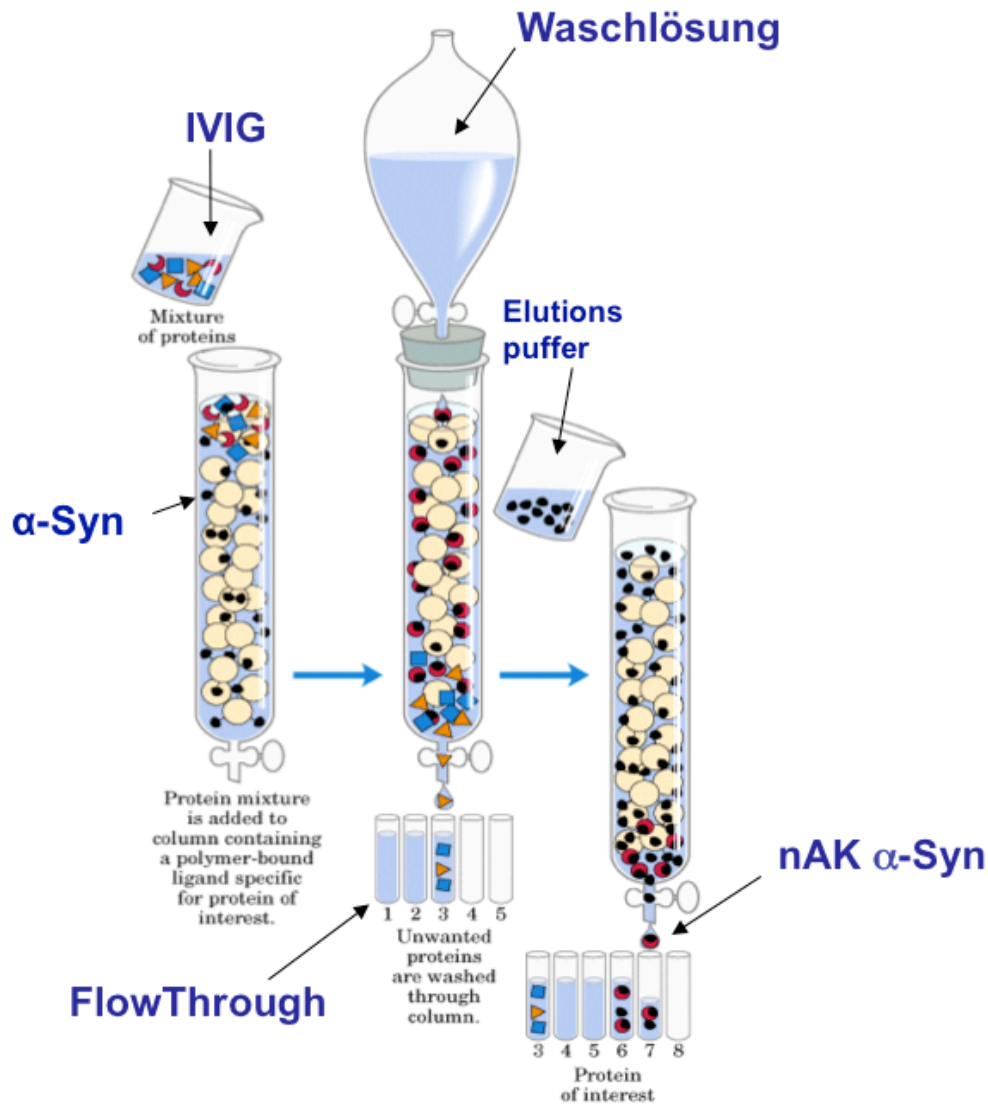


Abb. 4.2 Schematische Darstellung der Affinitätsaufreinigungssäule

Auf eine mit α -Synuclein gekoppelte Affinitätsssäule wurde eine IVIG-Zubereitung gegeben. Nach der Inkubation erfolgten mehrere Waschschrte, durch die unspezifisch gebundene Immunglobuline entfernt wurden. Der so erhaltene FlowThrough wurde als Kontrolle für die Versuche aufgehoben. Durch Zugabe von Glycinpuffer wurden die spezifisch an α -Synuclein gebundenen nAK α -Syn gelöst und gesammelt. Schematische Darstellung abgeändert nach (89).

4.1.2 Nachweis der Bindung der nAK α -Syn an α -Synuclein

Um zu testen, ob die aufgereinigten Autoantikörper auch wirklich spezifisch an α -Synuclein binden, wurden verschiedene, hier nun weiter aufgeführte, Bindungstests durchgeführt.

ELISA

α -Synuclein wurde auf eine ELISA-Platte gecoatet und dann mit einer nAK α -Syn-Verdünnungsreihe inkubiert. Als Kontrolle wurde eine weitere mit α -Synuclein gecoatete ELISA-Platte mit einer Verdünnungsreihe eines monoklonalen α -Synuclein-Antikörpers (mAK α -Syn) inkubiert (verwendet wurde hierzu der kommerziell erhältliche mAK α -Syn-Klon 211 von Invitrogen). Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Bindung sowohl des mAK α -Syn als auch der nAK α -Syn (Abb. 4.3). Beide ließen sich bis zum letzten Verdünnungsschritt mit einer Konzentration von 16,1 ng/mL detektieren. Der mAK α -Syn zeigte dabei je nach Konzentration eine 4 - 16x stärkere Bindungsaffinität an α -Synuclein als die nAK α -Syn.

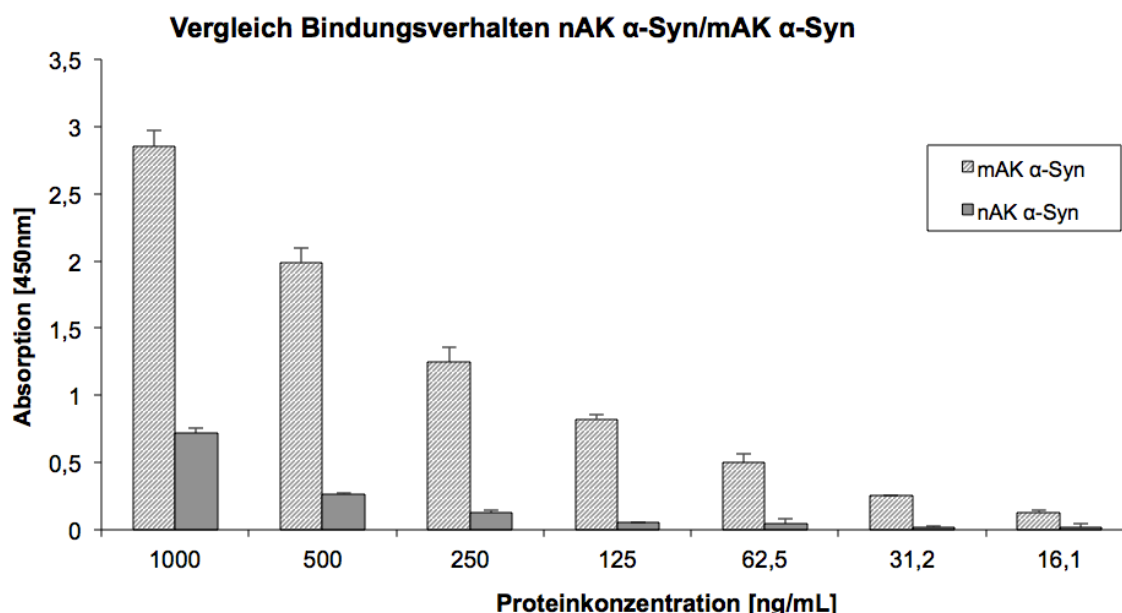


Abb. 4.3 Vergleich Bindungsverhalten von nAK α -Syn und mAK α -Syn im ELISA

Die ELISA-Platte wurde mit α -Syn in der Konzentration 1 μ g/ μ L gecoatet. Es wurden für jeweils 1 h mit den nAK α -Syn sowie mAK α -Syn ausgehend von der Konzentration 1000 ng/mL bis 16,1 ng/mL in einer Verdünnungsreihe inkubiert. Die Ergebnisse sind angegeben als die bei 450nm gemessene Absorption und dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (STABW). Sie stammen aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit Dreifachbestimmung.

Immunpräzipitation

In der Immunpräzipitation ist, im Gegensatz zum ELISA, die gesamte dreidimensionale Struktur des Antigens für den Antikörper besser zugänglich. Hier zeigte sich ebenfalls eine Bindung der nAK α -Syn an α -Synuclein (Abb. 4.4). Auch der FlowThrough (FT) band an α -Synuclein. Als Positivkontrolle wurde ein mAK α -Syn verwendet (α -Syn-Klon 211, Invitrogen), dieser zeigte das stärkste Bindungssignal. Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen wurden folgende Negativkontrollen verwendet: 1) Der für α -Synuclein unspezifische Antikörper gegen den Macrophage Migration Inhibitory Factor (monoklonaler MIF-AK, aus eigener Herstellung der Arbeitsgruppe). 2) Protein G, das Trägermaterial der Immunpräzipitation, an das die verschiedenen Antikörper gebunden werden. Damit sollte einerseits ausgeschlossen werden, dass α -Synuclein an unspezifische Antikörper bindet, andererseits, dass es, anstatt an die Antikörper, direkt an Protein G bindet. Es zeigte sich, dass beide Negativkontrollen nicht an α -Synuclein banden, was auf eine spezifische Bindung der nAK α -Syn an α -Synuclein rückschließen lässt. Die gleichzeitige Bindung von α -Synuclein durch den FlowThrough, die jedoch deutlich schwächer ausgeprägt war als durch die spezifischen α -Synuclein Autoantikörper, lässt sich durch die hohe Rate polyclonaler Antikörper im verbleibenden FlowThrough erklären, die eine Kreuzreaktivität aufweisen können.

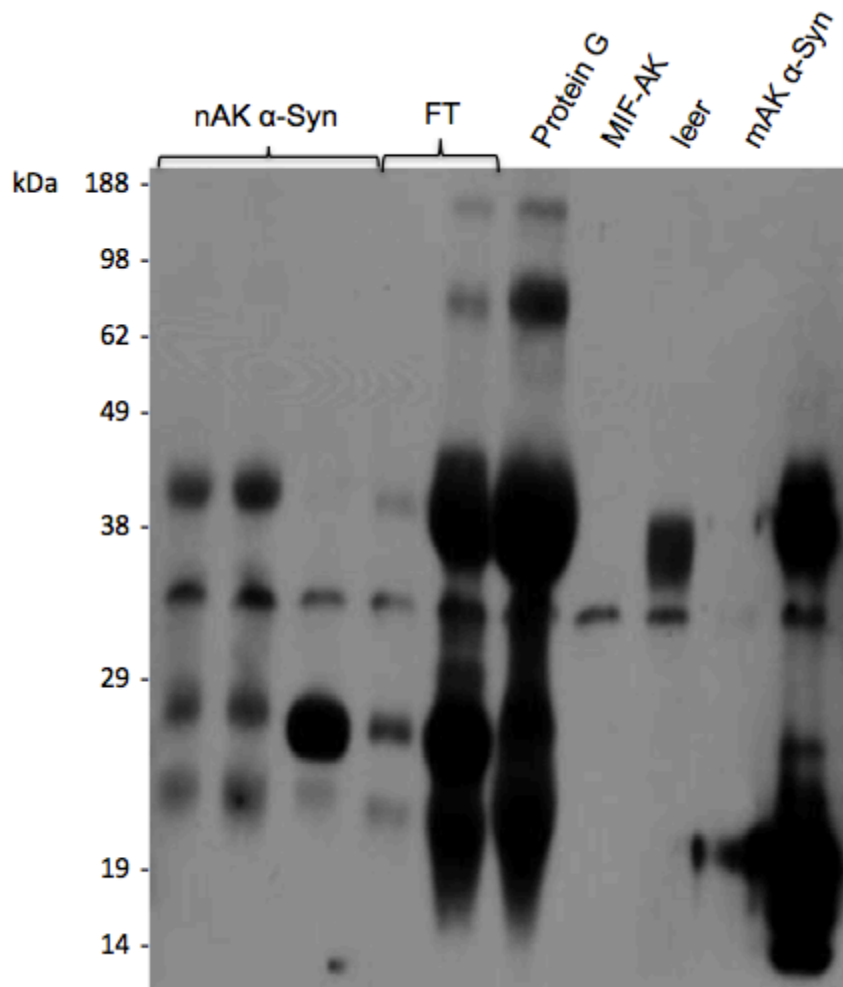


Abb. 4.4 Immunpräzipitation zum Nachweis der Bindung der nAK α -Syn an α -Syn
 α -Synuclein wurde an Protein G gebunden. Anschließend wurde diese Mischung mit den nAK α -Syn inkubiert. Als Negativkontrollen wurden der FT, sowie ein unspezifisch bindender AK (MIF-AK) und Protein G alleine, als Positivkontrolle ein mAK α -Syn verwendet. Die Proben wurden dann mittels Western Blot analysiert. Als Erstantikörper wurde mAK α -Syn 1 : 20.000 (α -Syn-Klon 211, Invitrogen) verwendet, als Zweitantikörper HRP linked anti-mouse-IgG-AK 1 : 50.000 (ThermoScientific).

4.2 Epitope Mapping

Wie im Abschnitt 3.1 dargestellt, konnten nAK α -Syn aus IVIG aufgereinigt und ihre spezifische Bindung an α -Synuclein nachgewiesen werden. In einem weiteren Schritt sollte nun bestimmt werden, auf welchem Abschnitt des α -Synucleins sich das Epitop für die nAK α -Syn befindet und inwieweit dieses von der α -Synuclein-Konformation abhängig ist.

Das Epitope Mapping sollte nach einem von Parker et al. beschriebenen Prinzip (97) mittels einer Affinitätssäule erfolgen: Deren Aufbau ist genau umgekehrt zur Aufreinigungssäule für die nAK: hier werden die Antikörper an das Trägermaterial gebunden, anschließend die freien Bindungsstellen abgesättigt und dann α -Synuclein an die auf der Säule gebundenen Antikörper gekoppelt. Mit Hilfe von Proteasen sollte dann ein limitierter Verdau des α -Synucleins erfolgen, und anhand der massenspektrometrisch festzustellenden Größe der abgespaltenen α -Synuclein-Reste auf die noch an der Säule und damit am Antikörper gebundenen α -Synuclein-Fragmente rückgeschlossen werden.

4.2.1. CarboLink™ -Säule

Ein erster Versuch erfolgte mit CarboLink™ Trägermaterial. Zur Methodenetablierung wurden die Versuche mit einem mAK α -Syn (α -Syn-Klon 211, Invitrogen) durchgeführt, da dieser die höchste Bindungsaffinität zu α -Synuclein aufweist.

Zunächst galt es zu determinieren, ob tatsächlich eine Bildung von a) dem Antikörper an das Trägermaterial und b) α -Synuclein an den Antikörper unter den Kopplungsbedingungen auf dieser Säule zustande kam.

Dazu wurde zunächst das Säulenmaterial auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 4.5A). Hier zeigten sich zwei deutliche Banden im Bereich von 22-75 Kilodalton (kDa), die mit leichter (22 kDa) und schwerer Kette (50 kDa) bzw. beiden zusammenhängend (72 kDa) des Antikörpers vereinbar sind. α -Synuclein besitzt ein Molekulargewicht von 14,46 kDa, aufgrund der hohen Azidität der C-terminalen Domäne läuft es im SDS-Gel jedoch nur bis 19 kDa (3). In diesem Versuch stellte sich im Bereich von 19 kDa nur eine schwache Bande dar, was darauf hinweist, dass α -Synuclein zwar gebunden wurde, jedoch nur in geringem Ausmaß.

Um spezifischer nachzuweisen, dass sich wirklich α -Synuclein auf dem Säulenmaterial befindet, wurde ein Western Blot durchgeführt mit dem α -Synuclein-spezifischen Antikörper FL 140, Santa Cruz Biotechnology (Abb. 4.5C). Auch dieser färbte die Bande im Bereich von 19 kDa an, wies dort also spezifisch α -Synuclein nach.

Um der Frage nachzugehen, wie hoch die Kopplungseffizienz der α -Synuclein-Bindung war, wurden die Waschdurchflüsse nach der Kopplung gesammelt und auf eine SDS-PAGE aufgetragen (Abb. 4.5B). Es fanden sich hier sehr deutliche Banden im α -Synuclein-Bereich von 19 kDa. Dies lässt darauf rückschließen, dass nur sehr wenig α -Synuclein wirklich an die mAK α -Syn auf der Säule gebunden und hingegen der Großteil des α -Synucleins durch die Waschschriffe wieder eluiert wurde.

Der darauffolgende Versuch wurde mit nAK α -Syn-gekoppelten Säule durchgeführt. Hierbei wurden die Kopplungsbedingungen leicht abgeändert, da zu vermuten war, dass durch im Anfangsprotokoll enthaltene starke Schüttelschritte die Bindungskapazität der Antikörper beeinträchtigt wurde.

In der SDS-PAGE fanden sich, wie zuvor, Banden im Bereich leichter und schwerer Kette des Antikörpers sowie von α -Synuclein (Abb. 4.6A). Diesmal sollte die Menge des in den Waschdurchflüssen enthaltenen α -Synucleins genauer quantifiziert werden, dazu wurde ein Mikro-BCA-Nachweis zur Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt (Abb. 4.6B).

Es zeigte sich, dass in den Durchflüssen 98,7 μ g α -Synuclein enthalten war, was bei initial eingesetzten 100 μ g α -Synuclein bedeutet, dass nur 1,3 μ g des Proteins tatsächlich an die Säule gekoppelt wurde, die Kopplungseffizienz also nur 1,3% betrug.

Dies weist darauf hin, dass auch unter den abgeänderten Kopplungsbedingungen keine ausreichende Bindung des α -Synucleins, weder an monoklonale noch an natürliche Autoantikörper, am Säulenmaterial möglich war. Deswegen erwies sich die CarboLink™-Säule als nicht geeignet für das geplante Epitope Mapping.

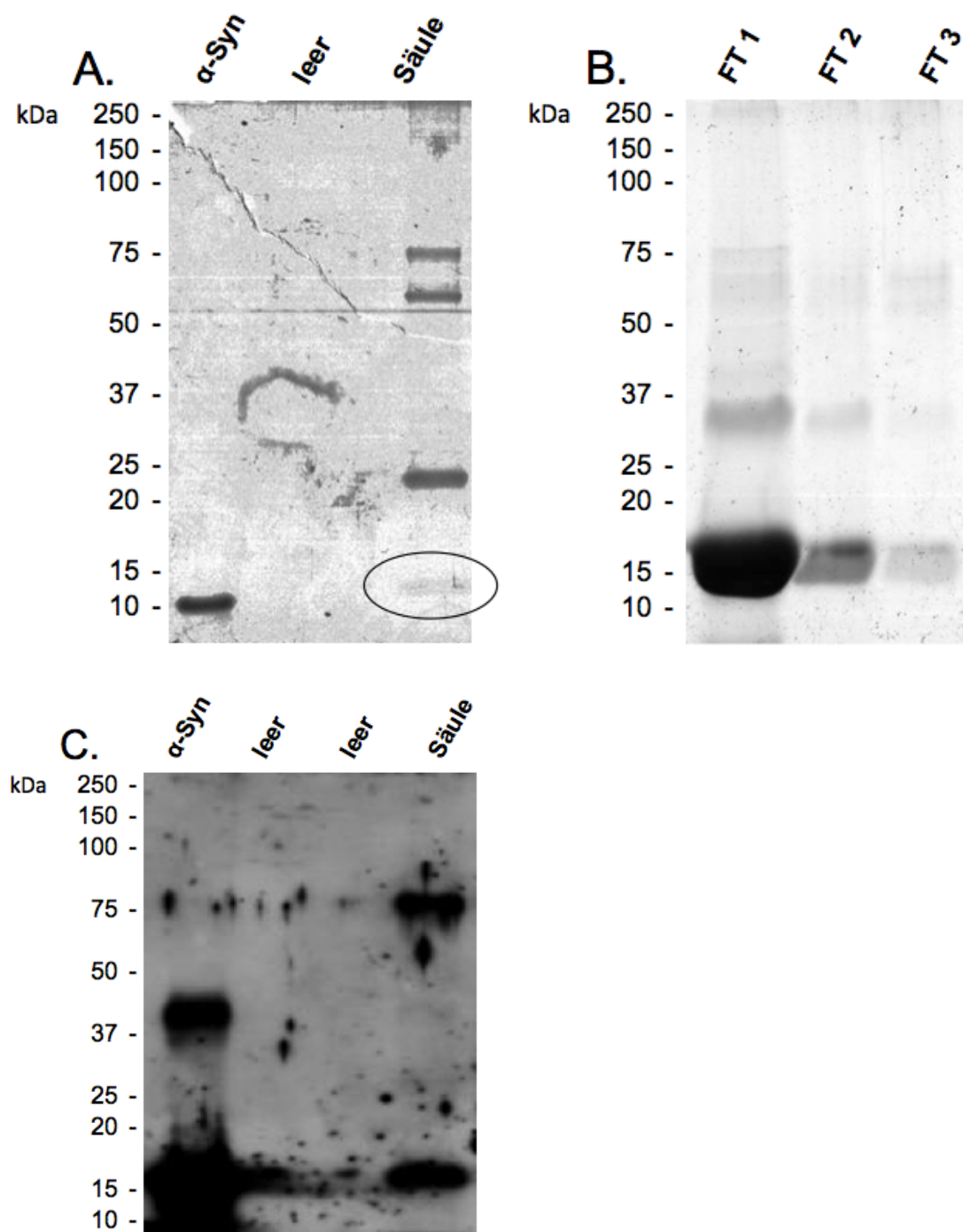


Abb. 4.5 CarboLink™-Säule mit mAK α -Syn

An CarboLink™ Coupling Gel wurden 100 μ g mAK α -Syn (α -Syn-Klon 211, Invitrogen) gekoppelt, anschließend wurde das Material geblockt, um weitere Bindung an das Säulenmaterial zu verhindern. Danach wurde mit 100 μ g α -Syn inkubiert. Es folgten mehrere Waschschrirte, um nicht gebundenes Material zu entfernen. **A.** 12% SDS-PAGE mit Säulenmaterial (Säule) zum Bindungsnachweis von nAK α -Syn und α -Syn (Kreis) an die Säule. Eine α -Syn-Kontrolle (α -Syn) wurde zum Vergleich mitaufgetragen. **B.** 12% SDS-PAGE mit Durchflüssen aus den Waschschrirten in absteigender zeitlicher Reihenfolge (FT 1-3). **C.** Western Blot nach 12% SDS-PAGE mit Säulenmaterial (Säule) zum spezifischen Bindungsnachweis von α -Syn. Eine α -Syn-Kontrolle (α -Syn) wurde zum Vergleich mitaufgetragen. Erstantikörper FL 140 1 : 8.000 (Santa Cruz Biotechnology), Zweitantikörper HRP linked anti-rabbit-IgG-AK 1 : 20.000 (Thermo-Scientific).

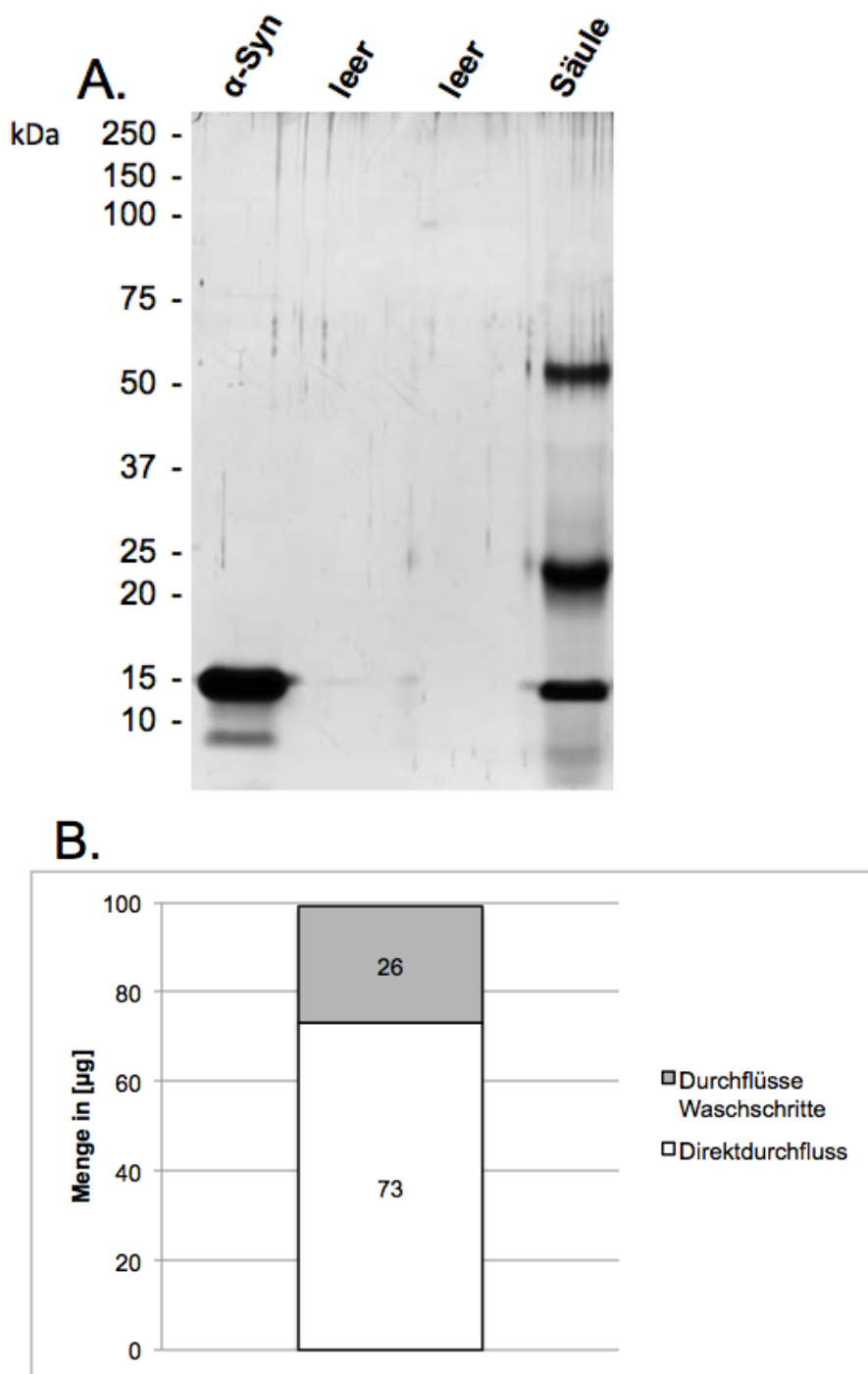


Abb. 4.6 CarboLink™-Säule mit nAK α -Syn

An CarboLink™ Coupling Gel wurden 100 μ g nAK α -Syn gekoppelt, anschließend wurde das Material geblockt, um weitere Bindungen an das Säulenmaterial zu verhindern. Danach wurde mit 100 μ g α -Syn inkubiert. Es folgten mehrere Waschschrte, um nicht gebundenes Material zu entfernen. **A.** 12% SDS-PAGE mit Säulenmaterial (Säule) zum Bindungsnachweis von α -Syn an die Säule. Eine α -Syn-Kontrolle (α -Syn) wurde zum Vergleich mitaufgetragen. **B.** Micro-BCA zum Proteinmengennachweis in den Durchflüssen der Waschschrte. Der weiß unterlegte Anteil entspricht dem Direktdurchfluss, der grau unterlegte Anteil den Durchflüssen der Waschschrte. Mengenangabe in [μ g].

4.2.2 Sepharose-Säule

Nachdem sich mit der CarboLink™-Säule keine hinreichenden Bindungsbedingungen von α -Synuclein an Antikörper gewährleisten ließen, wurde nun versucht, ob sich die Bindungsbedingungen durch ein anderes Säulenträgermaterial, nämlich Sepharose, verbessern ließen. Der Versuch wurde direkt mit den nAK α -Syn durchgeführt. Das Vorgehen entsprach ansonsten dem der CarboLink™-Säule nach dem abgeänderten Protokoll.

Auch hier wurde zum Bindungsnachweis Säulenmaterial auf eine SDS-PAGE aufgetragen (Abb. 4.7A). Es fanden sich deutliche Banden im Bereich 22-75 kDa, vereinbar mit schweren und leichten Ketten der nAK α -Syn. Diese banden also gut an Sepharose. Hingegen zeigte sich erneut im Bereich für α -Synuclein von 19 kDa nur eine sehr schwache Bande, was auch hier eine schlechte Bindung an die nAK α -Syn vermuten lässt. Um den α -Synuclein-Verlust in den Waschschritten zu beurteilen, wurden die einzelnen Waschdurchflüsse wiederum auf eine SDS-PAGE aufgetragen (Abb. 4.7B). Im α -Synuclein-Bereich von 19 kDa stellten sich deutliche Banden dar, was auf einen hohen Verlust bei den Waschschritten rückschließen lässt.

Insgesamt zeigte sich, dass durch die Verwendung von Sepharose als Trägermaterial die Kopplungseffizienz von α -Synuclein an die nAK α -Syn auf der Säule nicht verbessert werden konnte. Damit eignete sich auch die Sepharose-Säule nicht zum Epitope-Mapping.

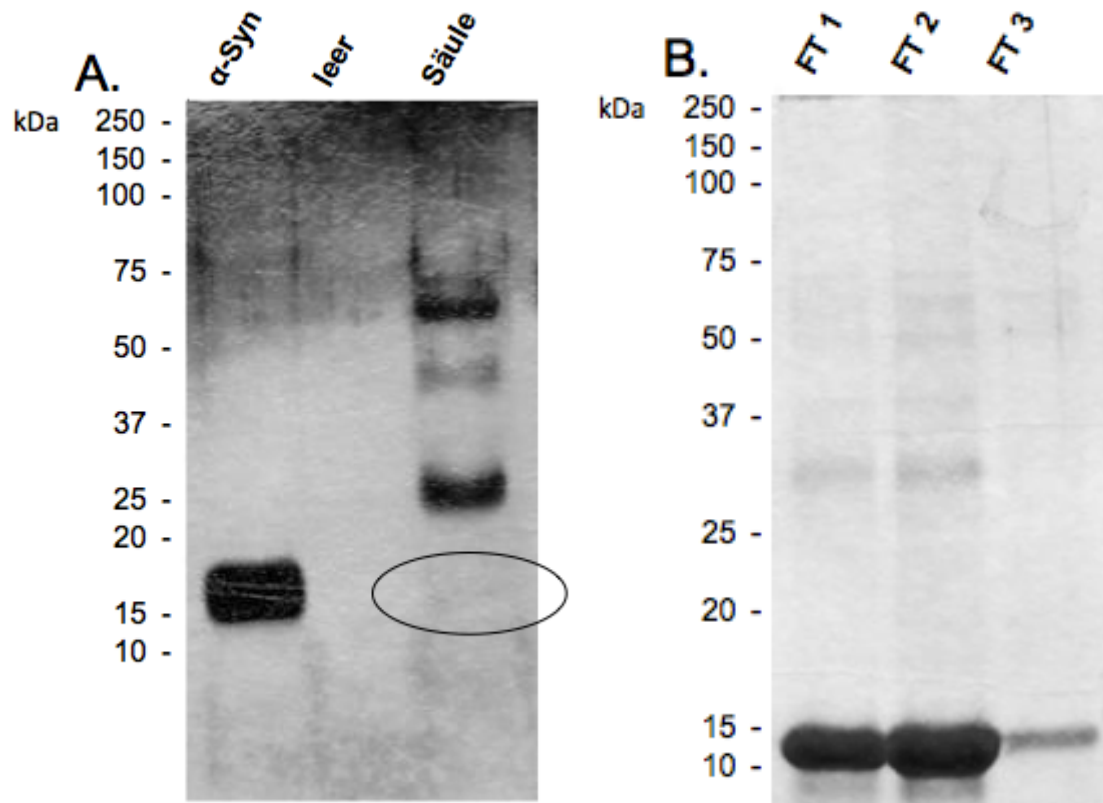


Abb. 4.7 Sepharose-Säule mit nAK α -Syn

An Sepharose-Gel wurden 100 μ g nAK α -Syn gekoppelt, anschließend wurde das Material geblockt, um weitere Bindung an das Säulenmaterial zu verhindern. Danach wurde mit 100 μ g α -Syn inkubiert. Es folgten mehrere Waschschrirte, um nicht gebundenes Material zu entfernen.

A. 12% SDS-PAGE mit Säulenmaterial (Säule) zum Bindungsnachweis von α -Syn an die Säule (Kreis). Eine α -Syn-Kontrolle (α -Syn) wurde zum Vergleich mitaufgetragen. **B.** 12% SDS-PAGE mit Durchflüssen aus den Waschschrirten (FT 1-3) in absteigender zeitlicher Reihenfolge.

4.3 α -Syn-Fragmente

Da mit den beschriebenen Affinitätssäulen kein Epitope-Mapping für die nAK α -Syn durchgeführt werden konnte, wurde die Fragestellung erweitert. Es sollte nun stattdessen das Bindungsverhalten der nAK α -Syn an vorgefertigte rekombinante α -Syn-Fragmente, hergestellt von der Firma rPeptide (Bogart, GA), untersucht werden. Auch sollte genauer betrachtet werden, inwieweit die α -Syn-Fragmente durch Alterung ihren Konformationszustand ändern und dies die Interaktion mit den nAK α -Syn verändert. Des Weiteren sollten die Auswirkungen der α -Syn-Fragmente auf primäre Zellen getestet werden, sowie deren mögliche Beeinflussbarkeit durch die nAK α -Syn.

Gewählt wurden α -Syn-Fragmente, die den einzelnen funktionellen Domänen des α -Synuclein entsprechen, sowie eine natürlich vorkommende α -Syn-Deletionsmutante (Abb. 4.8).

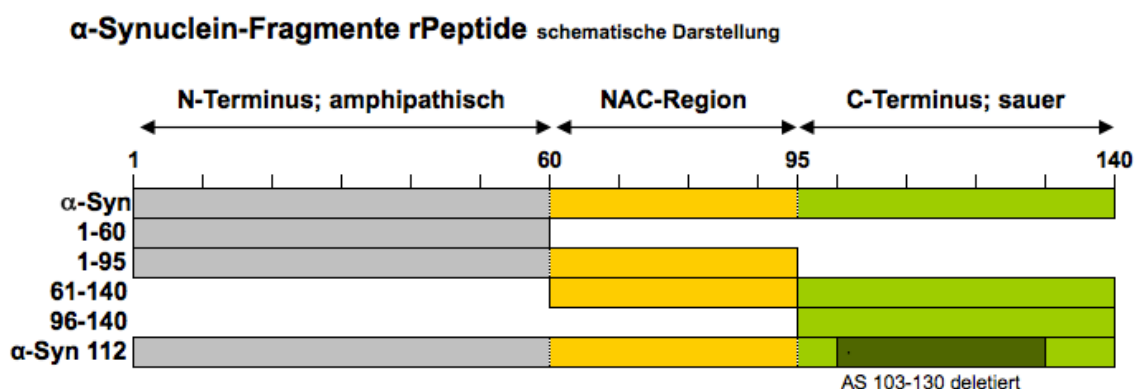


Abb. 4.8 α -Syn-Fragmente von r-Peptide (schematische Darstellung)

Das Protein α -Synuclein ist aus einer amphipathischen N-terminalen Domäne, der hoch konservierten NAC-Region und einer sauren C-terminalen Domäne aufgebaut. Die NAC-Region, erstmals als Bestand von Amyloidplaques bei Alzheimerpatienten entdeckt und daher *Non Amyloid Component* (NAC) benannt, scheint eine wichtige Rolle in der Toxizität und Aggregation von α -Synuclein zu spielen (9). Fragment 1-60 entspricht der N-terminalen Domäne, Fragment 1-95 der N-terminalen Domäne + NAC-Region, Fragment 61-140 der NAC-Region + C-terminalen Domäne und Fragment 96-140 nur der C-terminalen Domäne. Das Fragment α -Syn 112 ist eine durch alternatives Spleißen entstehende natürlich vorkommende Deletionsvariante von α -Synuclein, der die C-terminalen Aminosäuren 103-130 fehlen (Grafik selbst erstellt).

Um einen Überblick zu erhalten, in welcher Konformation sowohl frische als auch 7 Tage gealterte α -Syn-Fragmente vorliegen, wurden diese auf eine SDS-PAGE aufgetragen (Abb. 4.9). Alle α -Syn-Fragmente lagen größtenteils als Monomere vor, ein geringerer Anteil von Dimeren war jedoch unabhängig vom

Alterungszustand zu beobachten. Durch den Alterungsprozess erfolgte keine dort erkennbare Konformationsänderung. Das Fragment 61-140 ließ sich im gealterten Zustand nur noch sehr schwach darstellen, da es im Ladungsslot des Stacking Gels verblieb, in dem die Proteine vor der nachfolgenden Auftrennung im Separation Gel aufgetragen werden. Dies könnte einen Hinweis auf Aggregation darstellen, da höhermolekulare Proteine nicht mehr ins Separation Gel einwandern können. Im zuerst verwendeten 12%igen SDS-Gel ließ sich das Fragment 96-140 weder frisch noch gealtert nachweisen. Nach Literaturrecherche (94, 95) zur Darstellung C-terminaler α -Syn-Fragmente auf SDS-Gelen wurden die Gelbedingungen entsprechend abgeändert: Es wurde ein basischeres Stacking Gel gewählt, zudem wurde das Gel nach dem Durchlauf in 12%iger TCA-Lösung fixiert, um eine Ausschwemmung des niedermolekularen Fragments zu verhindern. Durch diese Änderungen ließ sich das Fragment 96-140 schließlich darstellen (Abb. 4.9C). Jedoch fand sich die Proteinbande nicht, wie aufgrund des Molekulargewichts zu erwarten, bei 5 kDa, sondern bei 18 kDa, da sich durch die Azidität der C-terminalen Domäne die Laufgeschwindigkeit des Fragments im SDS-Gel stark verlangsamt (60).

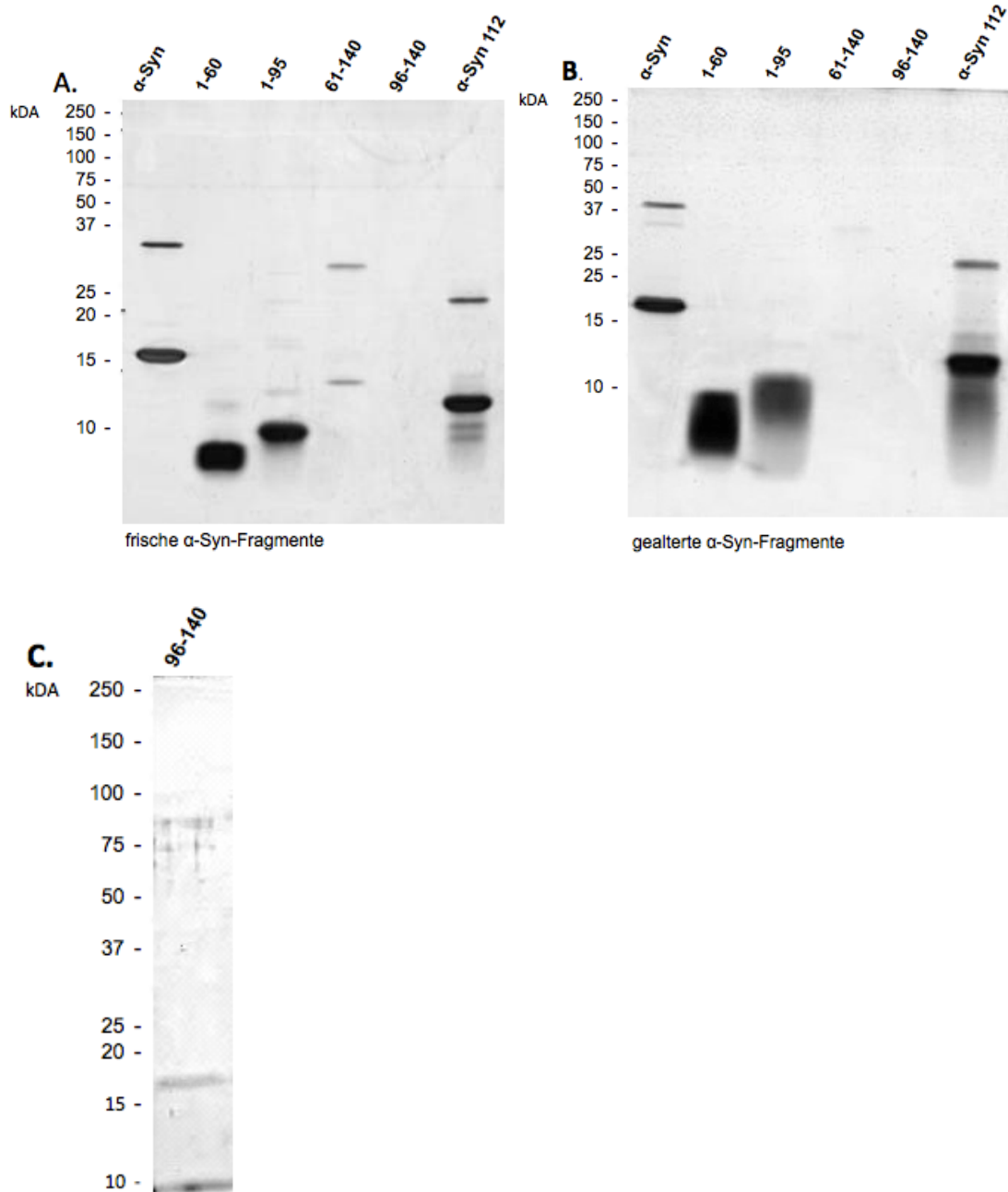


Abb. 4.9 Darstellung der α -Syn-Fragmente auf nativer SDS-PAGE

A. frische Fragmente. **B.** gealterte Fragmente.

C. Da sich unter den normalen Gelbedingungen das Fragment 96-140 nicht darstellen ließ, wurden diese entsprechend abgeändert (s. Text). Dieses Fragment wandert aufgrund seiner Azidität nur langsam, deshalb findet sich die eigentlich bei 5 kDa zu erwartende Proteinbande bei 18 kDa.

4.3.1 Dot Blot

Im Dot Blot lässt sich gut das Bindungsverhalten unter konformationsfreien Bindungsbedingungen nachweisen.

Inkubation mit nAK α -Syn:

Die nAK α -Syn binden als Positivkontrolle α -Synuclein sowie die Fragmente 1-95 (nur in den höchsten Konzentrationen), 61-140 und α -Syn 112. Dabei führte das Fragment 61-140 als einziges Fragment zu einem stärkeren Bindungssignal als die eigentliche α -Synuclein-Kontrolle. Das Fragment 1-60 wurde nur leicht im gealterten Zustand gebunden, Fragment 96-140 wurde gar nicht gebunden.

Bei den Fragmenten, die bereits im frischen (Abb. 4.10) Zustand gebunden wurden, änderte sich das Bindungsverhalten der nAK α -Syn nicht wesentlich im Vergleich zu den gealterten Fragmenten (Abb. 4.11). Zur Überprüfung der spezifischen Bindung der nAK α -Syn an α -Synuclein wurden zusätzlich die Proteine Casein und humanes Serumalbumin (HSA) auf die Dot Blot Membran aufgetragen. Beide sind gut als Kontrolle geeignet, da sie als höhermolekulare Proteine eine Vielzahl von Konformationen und damit potentiellen Epitopen darbieten. HSA wurde nicht durch die nAK α -Syn gebunden, Casein hingegen schon (Abb. 4.11). Bedingt sein könnte dies durch eine Kreuzreaktivität der nAK α -Syn gegen bestimmte Konformationen von Casein. Im ELISA (siehe unten), bei dem die Antigendarbietung auf einer Platte und nicht auf einer Membran wie beim Dot Blot erfolgt, reagieren die nAK α -Syn jedoch nicht mit Casein. Dies weist darauf hin, dass die im Dot Blot gefundene Kreuzreaktivität der nAK α -Syn mit Casein durch die dort herrschenden speziellen Bindungsbedingungen begründet ist.

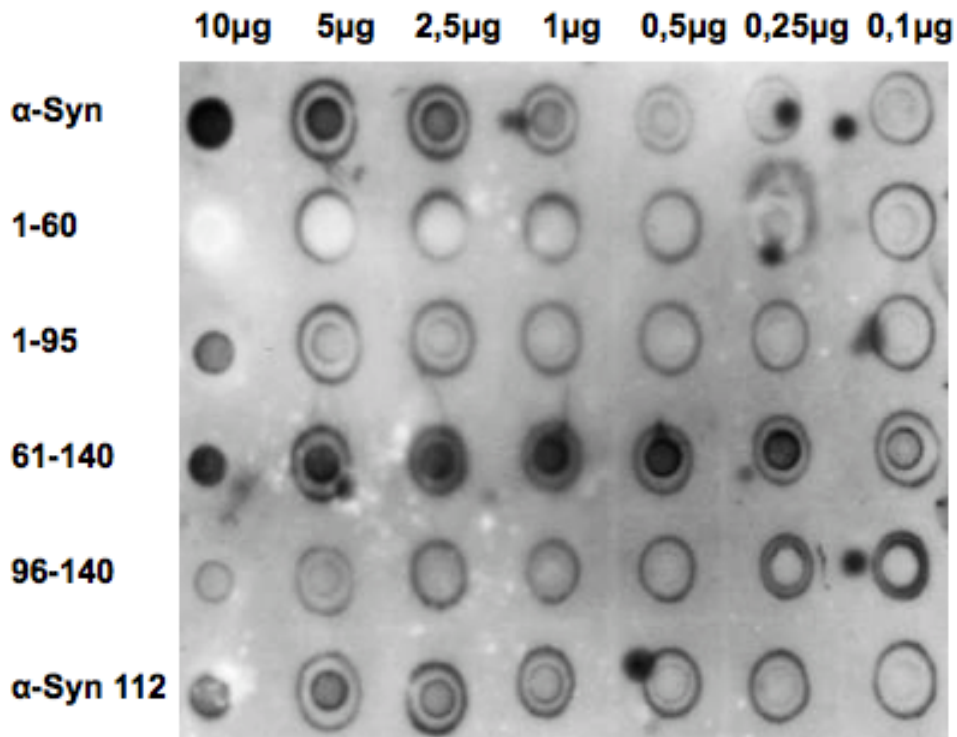


Abb. 4.10 Bindungsverhalten nAK α-Syn an frische α-Syn-Fragmente

α-Syn und die α-Syn-Fragmente wurden ausgehend von der Konzentration 10 μg in jeweils einer Verdünnungsreihe auf eine Membran aufgetragen. Anschließend wurde mit den nAK α-Syn als Erstantikörper in der Verdünnung 1 : 1.000, sowie einem HRP-linked anti-human-IgG-AK (ThermoScientific) als Zweitantikörper in der Verdünnung 1 : 100.000, inkubiert und ein Film belichtet.

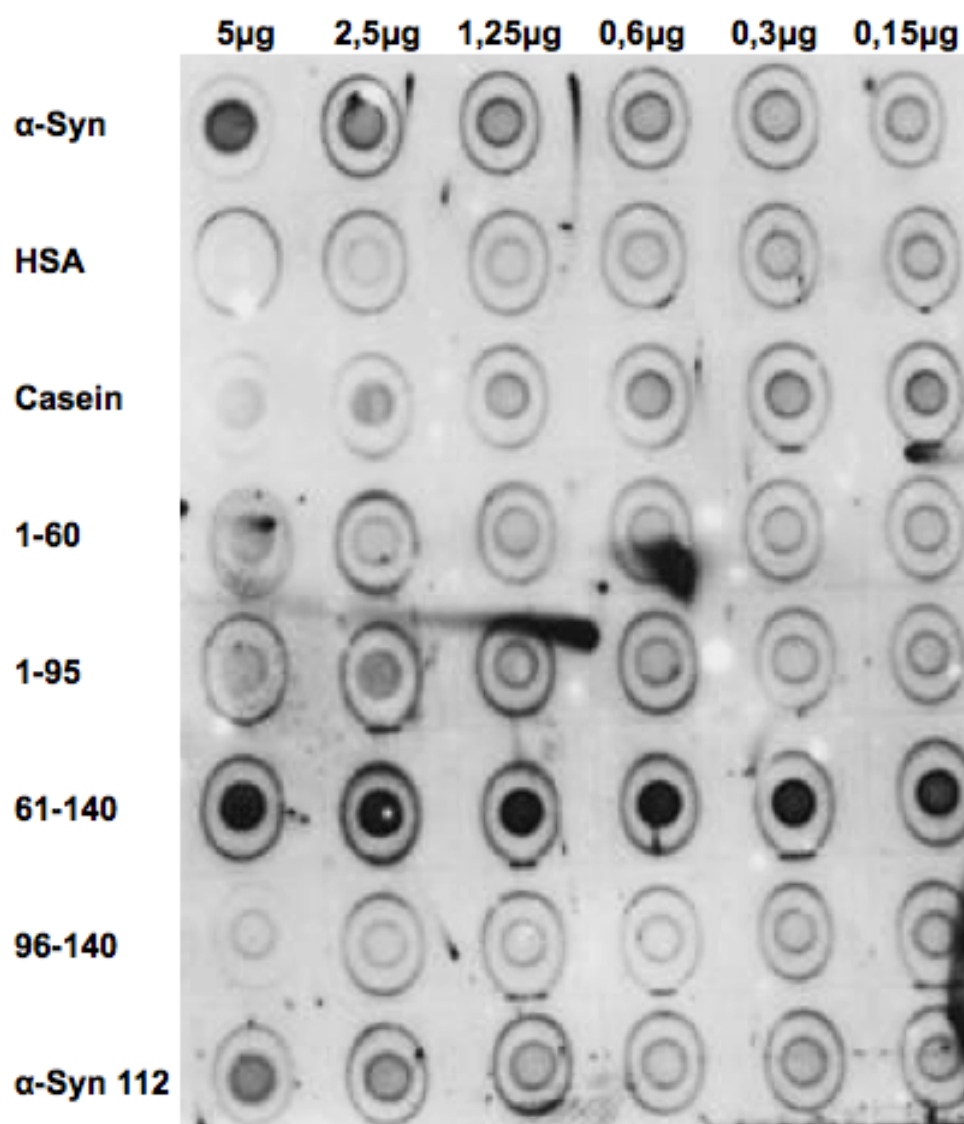


Abb. 4.11 Bindungsverhalten nAK α-Syn an gealterte α-Syn-Fragmente

α-Syn und die α-Syn-Fragmente wurden ausgehend von der Konzentration 5 μg in jeweils einer Verdünnungsreihe auf eine Membran aufgetragen. Anschließend wurde mit den nAK α-Syn als Erstantikörper in der Verdünnung 1 : 1.000, sowie einem HRP-linked anti-human-IgG-AK (ThermoScientific) als Zweitantikörper in der Verdünnung 1 : 100.000, inkubiert und ein Film belichtet.

Inkubation mit FlowThrough:

Der FlowThrough band an die α -Synuclein-Kontrolle sowie schwach an hohe Konzentrationen der Fragmente 1-95, 61-140 und α -Syn 112 (Abb. 4.12). Diese Bindung an α -Syn(-Fragmente) ist mit einer schwachen Kreuzreaktivität der polyklonalen IgG-Antikörper im FlowThrough vereinbar.

Die Kontrolle HSA wurde nicht gebunden. Die Kontrolle Casein wies jedoch ein sehr starkes Bindungssignal auf. Dieses war noch ausgeprägter als das durch Inkubation mit den nAK α -Syn erzielte Bindungssignal an Casein (Abb. 4.11). Erklärt werden kann dies dadurch, dass das hochmolekulare Protein Casein sich zusammenlagert und dann von kreuzreaktiven polyklonalen humanen Antikörpern aus dem IgG-Pool des FlowThroughs erkannt wird.

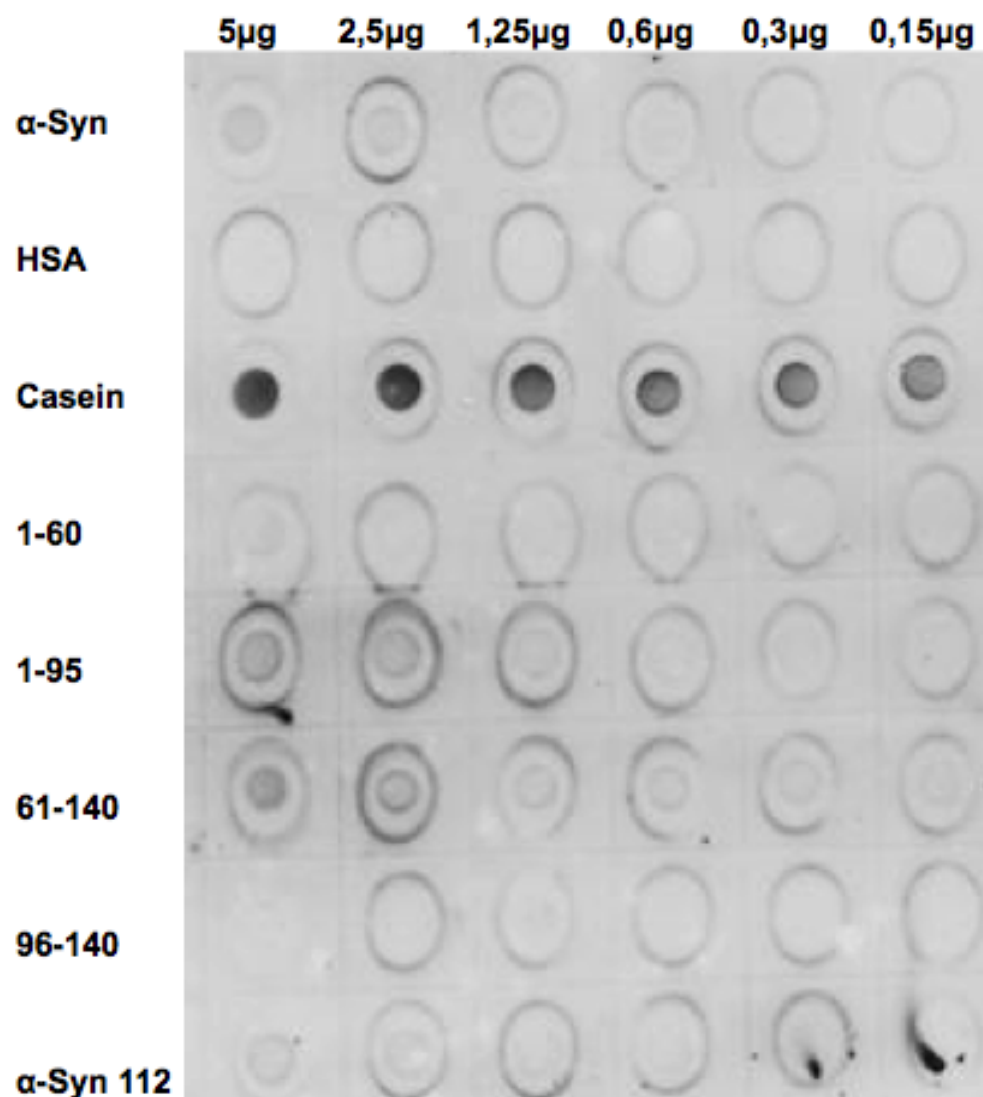
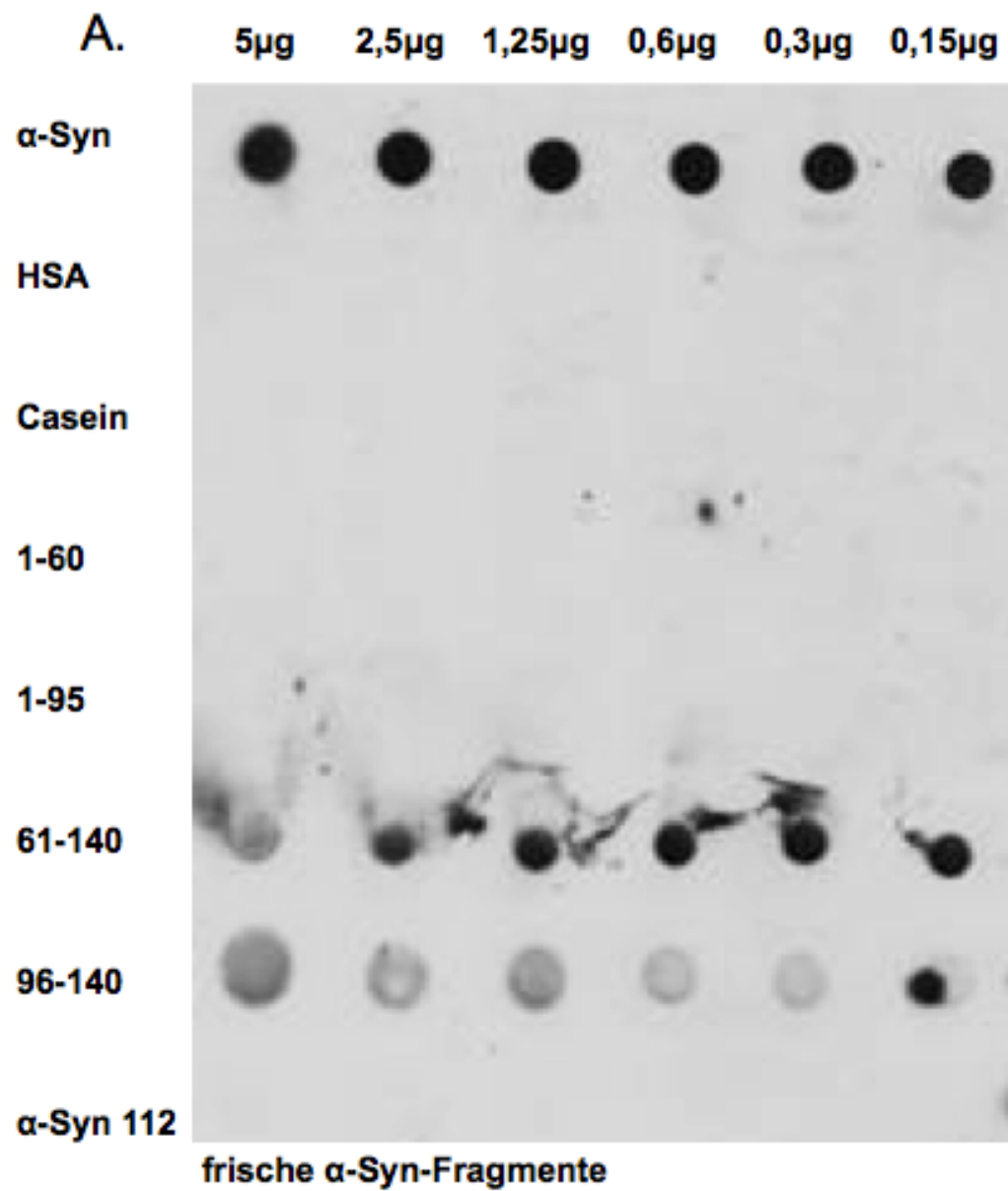


Abb. 4.12 Bindungsverhalten FT an α-Syn-Fragmente

Gealtertes α-Syn sowie α-Syn-Fragmente wurden ausgehend von der Konzentration 5 µg in jeweils einer Verdünnungsreihe auf eine Membran aufgetragen. Anschließend wurde mit FT als Erstantikörper in der Verdünnung 1 : 1.000, sowie einem HRP-linked anti-human-IgG-AK (ThermoScientific) als Zweitantikörper in der Verdünnung 1 : 100.000, inkubiert und ein Film belichtet.

Inkubation mit mAK α -Syn:

Im Vergleich zum Bindungsverhalten der nAK α -Syn wurde nun das Bindungsverhalten eines monoklonalen α -Synuclein Antikörpers (mAK α -Syn aka α -Syn-Klon 211, Invitrogen) an die unterschiedlichen Fragmente untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der mAK α -Syn nur die α -Synuclein-Kontrolle sowie die Fragmente 61-140 und 96-140 band. Das Epitop dieses mAK α -Syn befindet sich auf den C-terminalen Aminosäuren 121-125 von α -Synucleins. 61-140 und 96-140 sind die einzigen Fragmente mit intakter C-terminaler Domäne und werden daher erwartungsgemäß von mAK α -Syn gebunden. Gealterte Fragmente (Abb. 11C) wurden gleichermaßen wie frische Fragmente (Abb. 11D) konzentrationsabhängig gebunden. Die Kontrollen HSA und Casein wurden nicht durch den mAK α -Syn gebunden.



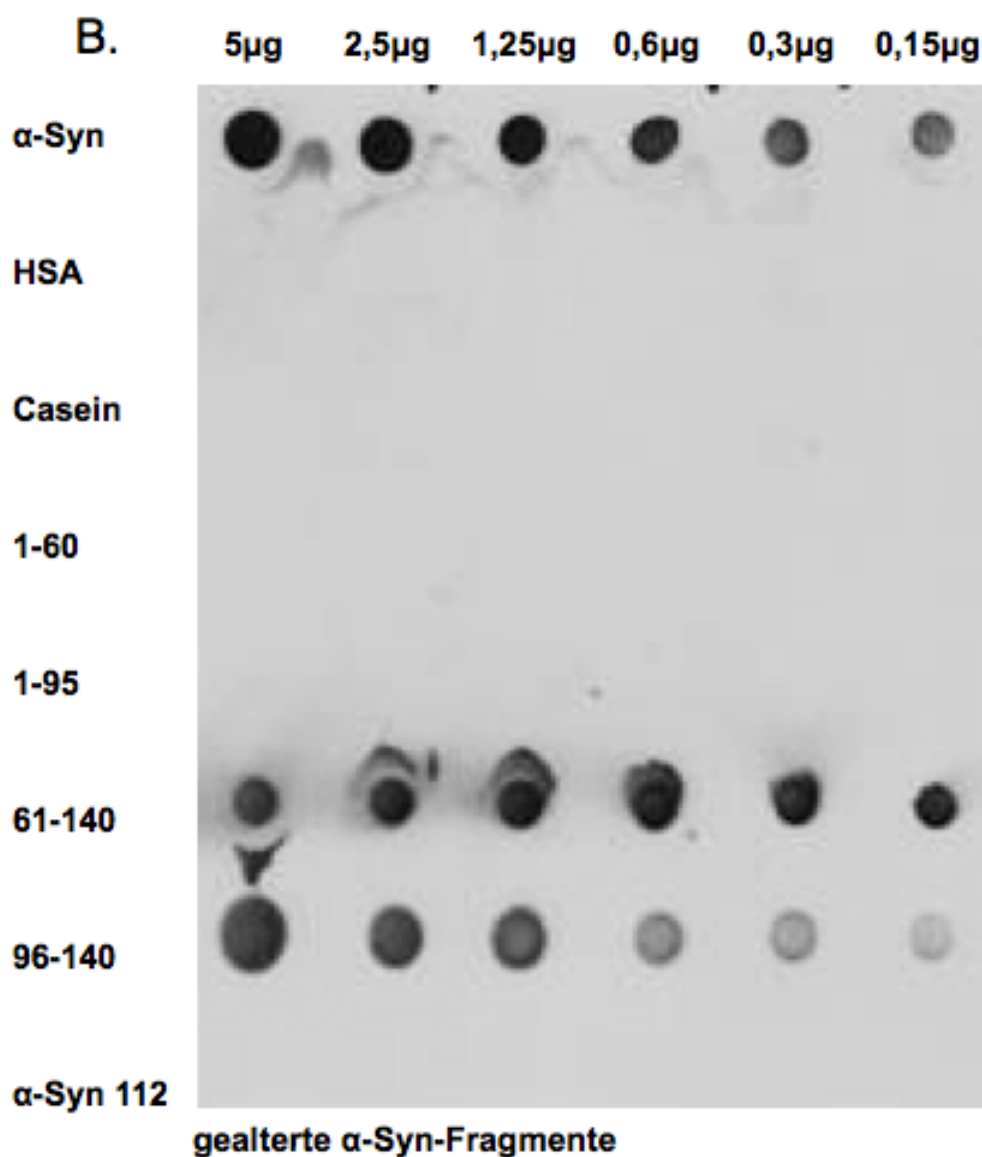


Abb. 4.13 Bindungsverhalten mAK α-Syn an α-Syn-Fragmente

A. und B. Frisches (A.) und gealtertes (B.) α-Syn sowie α-Syn-Fragmente wurden ausgehend von der Konzentration 5 µg in jeweils einer Verdünnungsreihe auf eine Membran aufgetragen und mit mAK α-Syn als Erstantikörper in der Verdünnung 1 : 20.000 inkubiert (α-Syn-Klon 211, Invitrogen). Als Zweitantikörper wurde ein HRP linked anti-mouse-IgG-AK in der Verdünnung 1 : 50.000 verwendet (ThermoScientific). Anschließend wurde ein Film belichtet.

Zusammenfassung:

Insgesamt ließ sich im Dot Blot eine weitgehend spezifische Bindung der nAK α-Syn an die Fragmente 1-95, 61-140 und α-Syn 112 feststellen. Dabei wies das Fragment 61-140 das stärkste Bindungssignal auf. Der unterschiedliche Alterungszustand der Fragmente hatte keinen Einfluss auf deren Bindungsverhalten.

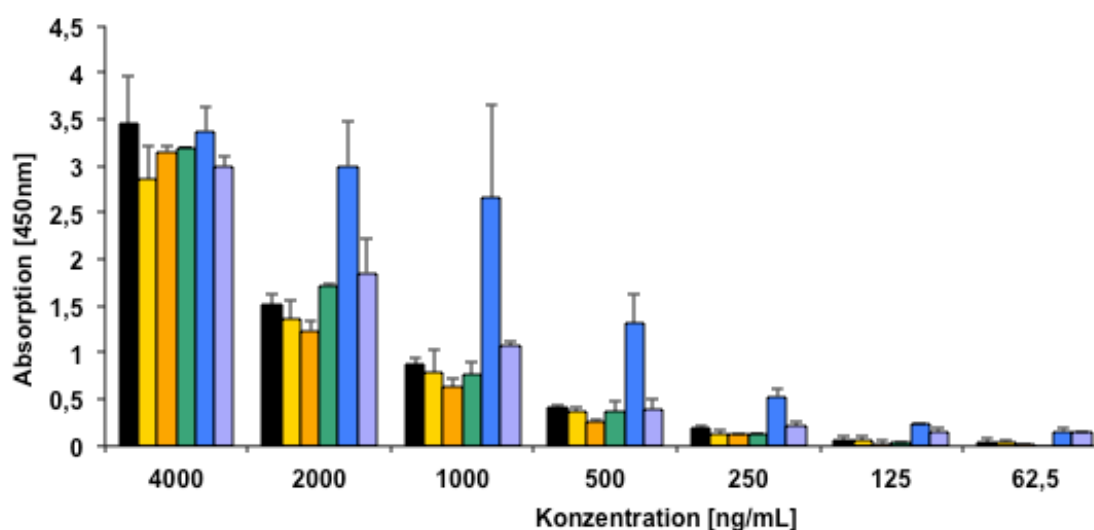
4.3.2 Bindungs-ELISA

Im ELISA kann ebenfalls das Bindungsverhalten von Antigen und Antikörper untersucht werden. Die Proteine werden dabei auf eine ELISA-Platte aufgetragen und von dieser partiell adsorbiert. Dadurch liegen unter Umständen nicht ihre ganzen Bindungsstellen frei zugänglich vor. Ähnlich zu dem in Abschnitt 4.1.2 beschriebenen Bindungs-ELISA wurden hier α -Synuclein-Kontrolle und -Fragmente auf eine ELISA-Platte gebunden und mit den nAK α -Syn inkubiert.

Inkubation mit nAK α -Syn:

Die nAK α -Syn banden sowohl an die α -Synuclein-Kontrolle als auch konzentrationsabhängig an alle α -Syn-Fragmente. Hierbei wies das Fragment 96-140 das stärkste Bindungssignal auf. Die Fragmente 61-140 und α -Syn 112 zeigten ein der α -Synuclein-Kontrolle vergleichbares Bindungssignal. Die Fragmente 1-60 und 1-95 wurden schwächer als die α -Synuclein-Kontrolle gebunden, dabei Fragment 1-60 am schwächsten. Es fanden sich keine klar ersichtlichen Bindungsunterschiede zwischen frischen (Abb. 4.14A) und gealterten (Abb. 4.14B) Fragmenten. Auch durch eine Verbesserung des Versuchsprotokolls, mit dem die Spezifität gegenüber Kontrollen gesteigert werden konnte (s.u.), veränderte sich das Bindungsverhalten der nAK α -Syn an die α -Syn-Fragmente nicht.

A. frische Peptidfragmente + nAK α -Syn



B. gealterte Peptidfragmente + nAK α -Syn

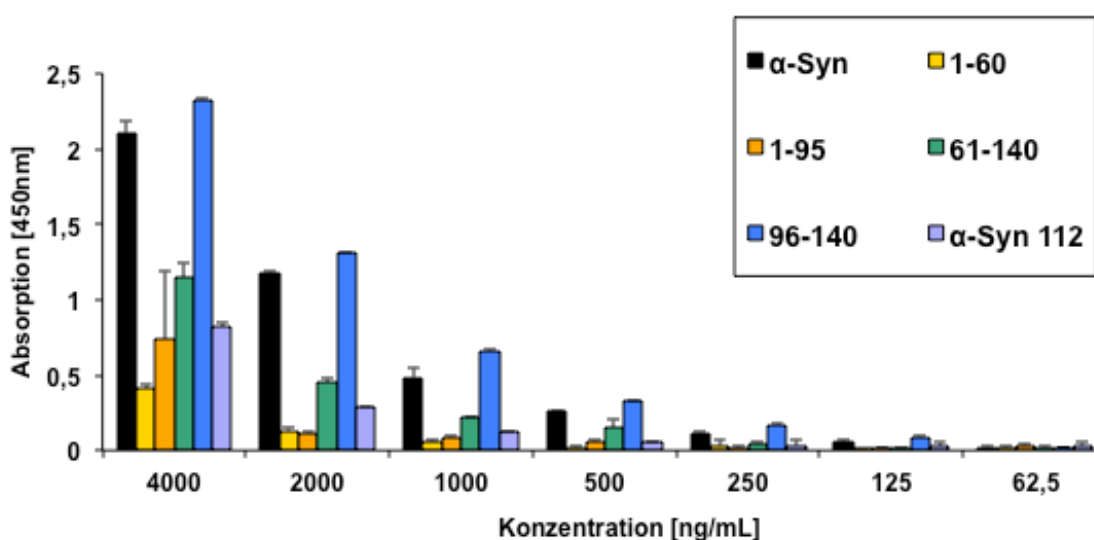


Abb. 4.14 Bindungsverhalten nAK α -Syn an α -Syn-Fragmente

Alle Fragmente und α -Syn wurden in der Konzentration 1 μ M/ μ L auf eine ELISA-Platte gecoat und mit nAK α -Syn in einer Verdünnungsreihe mit jeweils 1 : 1 Verdünnungsschritten inkubiert. **A.** frische Fragmente **B.** gealterte Fragmente. Die Ergebnisse sind angegeben als die bei 450nm gemessene Absorption und dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (STABW). Sie stammen aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit Zweifachbestimmung.

Inkubation mit mAK α -Syn:

Die mAK α -Syn (α -Syn-Klon 211, Invitrogen) banden nur an die α -Synuclein-Kontrolle sowie konzentrationsabhängig und unabhängig vom Alterungszustand an die Fragmente 61-140 und 96-140 (Abb. 4.15A + B). Dies sind die einzigen Fragmente, die das Epitop für den mAK α -Syn (C-terminale Aminosäuren 121-

125) enthalten. Somit zeigt dieses Ergebnis die Bindungsspezifität des mAK α -Syn unter den Bedingungen dieses ELISAs.

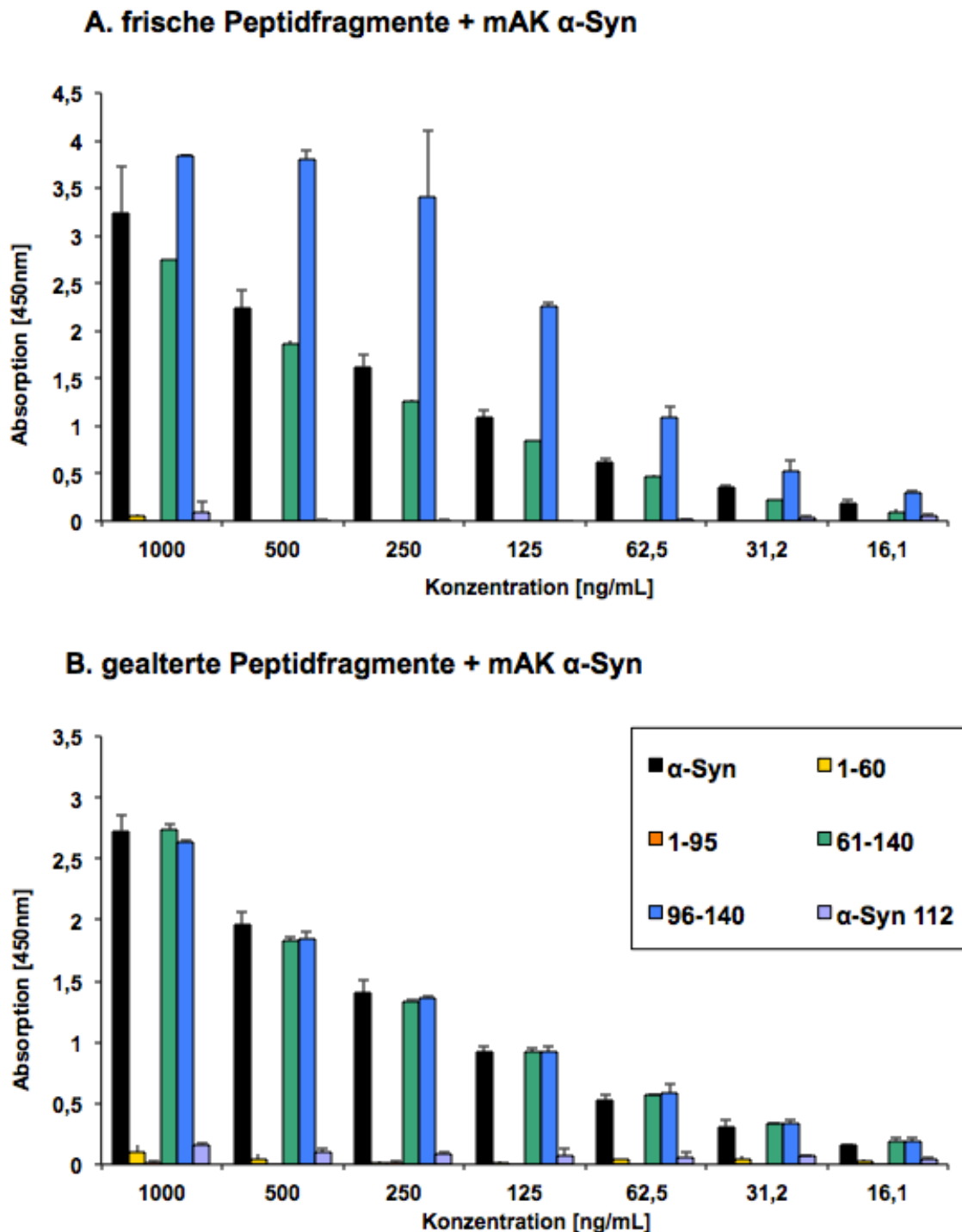


Abb. 4.15 Bindungsverhalten mAK α -Syn an α -Syn-Fragmente

Alle Fragmente und α -Syn wurden in der Konzentration 1 μ M/ μ L auf eine ELISA-Platte gecoatet und mit mAK α -Syn (α -Syn-Klon 211, Invitrogen) in einer Verdünnungsreihe mit jeweils 1 : 1 Verdünnungsschritten inkubiert. **A.** frische Fragmente nach dem alten Protokoll, **B.** gealterte Fragmente nach dem alten Protokoll. Alle Ergebnisse sind angegeben als die bei 450nm gemessene Absorption und dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (STABW). Sie stammen aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit Zweifachbestimmung.

Zusätzliche Negativkontrollen

Inkubation mit Zweitantikörper:

Hierbei wurden die auf der ELISA-Platte gebundenen Fragmente nur mit dem Zweitantikörper (Peroxidase labeled goat-anti-human-AK, Calbiochem) inkubiert, ohne vorige Anwendung eines Erstantikörpers. Dabei zeigte sich keine wesentliche Bindung an α -Synuclein-Kontrolle oder Fragmente (Abb. 4.16). Dies sichert ab, dass der verwendete Zweitantikörper nicht auch eigenständig an die Fragmente bindet.

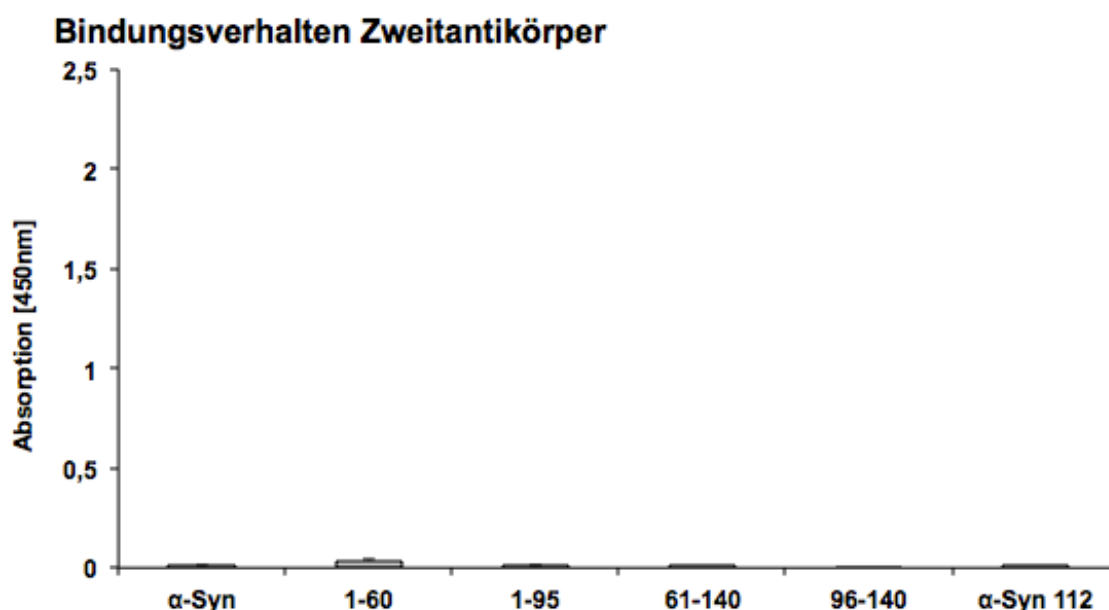


Abb. 4.16 Bindungsverhalten Zweitantikörper an α -Syn-Fragmente

Alle Fragmente und α -Synuclein wurden in der Konzentration 1 μ M/ μ L auf eine ELISA-Platte gecoatet und mit dem Zweitantikörper (Peroxidase labeled goat-anti-human-AK, Calbiochem) inkubiert. Alle Ergebnisse sind angegeben als die bei 450nm gemessene Absorption und dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (STABW). Sie stammen aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit Zweifachbestimmung.

Inkubation mit FlowThrough:

Um zu untersuchen, wie spezifisch die Bindung der nAK α -Syn an die Fragmente ist, wurde zur Kontrolle auch das Bindungsverhalten des FlowThroughs im direkten Vergleich zu den nAK α -Syn untersucht (Abb. 4.17).

Hier zeigten sich jedoch erhebliche unspezifische Bindungen, was eine Überarbeitung des ELISA-Protokolls zur Folge hatte. Dabei wurden sechs zusätzliche Waschschriffe hinzugefügt (siehe auch Abschnitt 3.7.1). Danach wurde der ELISA erneut mit dem veränderten Protokoll durchgeführt. Nun zeigte sich,

dass die nAK α -Syn unverändert an α -Synuclein-Kontrolle und Fragmente banden, wobei jedoch der FT nur noch ein schwaches Bindungssignal hervorrief. Dies zeigt, dass durch das verbesserte Protokoll die Spezifität des ELISAs erheblich gesteigert werden konnte.

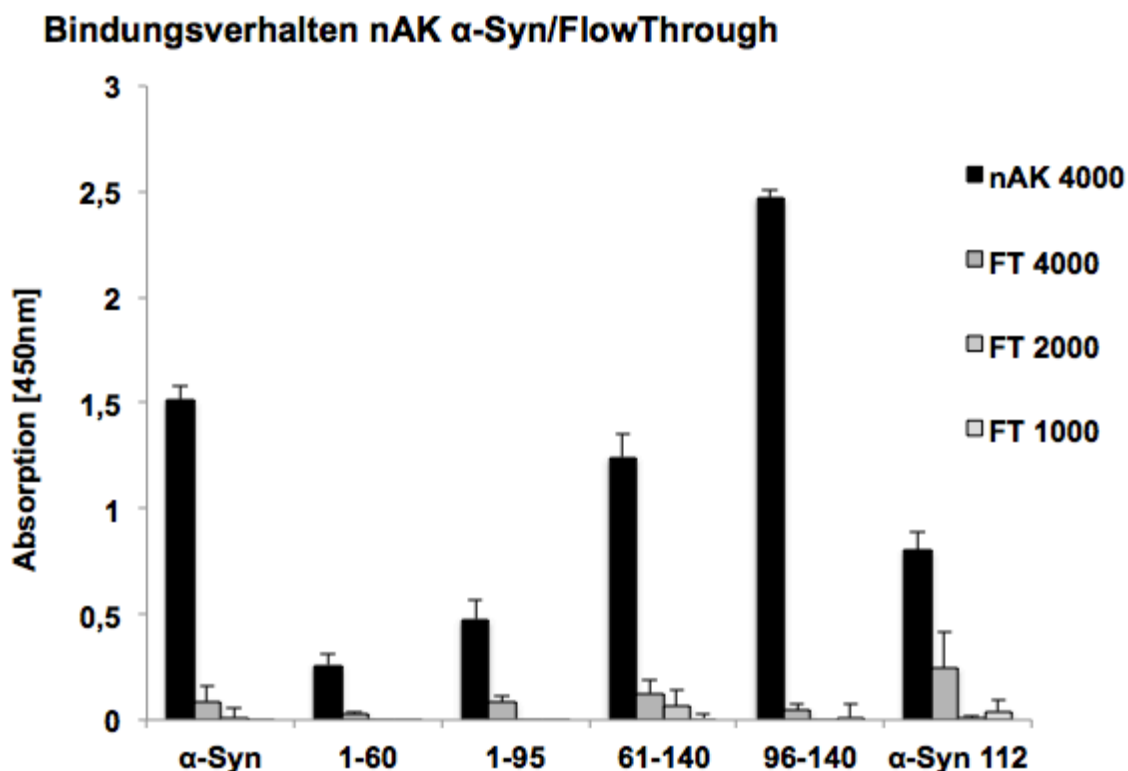


Abb. 4.17 Bindungsverhalten nAK α -Syn/ FT an α -Syn-Fragmente

Alle Fragmente und α -Synuclein wurden in der Konzentration 1 μ M/ μ L auf eine ELISA-Platte gecoatet. Die nAK α -Syn sowie zum Vergleich der FlowThrough wurden jeweils in der Konzentration 4000 ng/mL aufgetragen. Ausgehend von der höchsten FlowThrough-Konzentration wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 2000, 1000, 500 und 250 ng/mL erstellt. Die Ergebnisse sind angegeben als die bei 450nm gemessene Absorption und dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (STABW). Sie stammen aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit Zweifachbestimmung.

Kontrolle mit HSA und Casein:

Ein weiterer Schritt in der Spezifitätsprüfung des ELISAs bestand in der Frage, ob die nAK α -Syn hier wirklich nur an α -Synuclein sowie α -Syn-Fragmente binden, und nicht auch andere Proteine. Hierzu wurden die höhermolekularen Proteine humanes Serumalbumin (HSA) und Casein, jeweils mit einer α -Synuclein-Kontrolle zum direkten Vergleich, auf eine ELISA-Platte gecoatet. Mit mAK α -Syn (α -Syn-Klon 211, Invitrogen), nAK α -Syn sowie FT wurden jeweils Verdünnungsreihen inkubiert. Dabei zeigte sich jedoch mit dem herkömmlichen Protokoll das Vorhandensein unspezifischer Bindungen. Der

Versuch wurde daraufhin mit dem verbesserten Protokoll wiederholt, welches auch schon bei der FlowThrough-Kontrolle verwendet wurde (s.o.). Nun konnte gezeigt werden, dass die nAK α -Syn spezifisch an α -Synuclein binden und nur sehr schwach an HSA oder Casein. Für den mAK α -Syn zeigte sich eine unveränderte spezifische Bindung an α -Synuclein. Der FT band nur schwach an α -Synuclein. Er band weiterhin an HSA (Abb. 4.18A) und Casein (Abb. 4.18B), was aber mit dem Vorkommen einer darin zu erwartenden Mischung sehr vieler polyklonaler Antikörper vereinbar ist. Durch Veränderung des Protokolls konnte also auch hier die Bindungsspezifität des ELISAs für die nAK α -Syn erheblich gesteigert werden.

Zusammenfassung:

Die verschiedenen Kontrollen deckten große Defizite in der Spezifität des herkömmlichen Protokolls auf. Durch das Einfügen zusätzlicher Waschschriffe konnten diese aber behoben werden. Die Spezifitätsprobleme im alten Protokoll beeinflussten allerdings nicht die Ergebnisse der bereits damit durchgeführten Bindungs-ELISAs mit nAK α -Syn und α -Syn-Fragmenten. Diese waren auch in der Versuchsdurchführung nach dem verbesserten Protokoll unverändert.

Die durchgeführten ELISAs zeigten, dass die nAK α -Syn hier, im Gegensatz zum Dot Blot, an alle α -Syn-Fragmente banden. Das Fragment 96-140, das unter Dot Blot-Bedingungen gar nicht gebunden wurde, wies im ELISA durchgehend das höchste Bindungssignal auf. Bindungsunterschiede zwischen frischen und gealterten Fragmenten waren nicht ersichtlich.

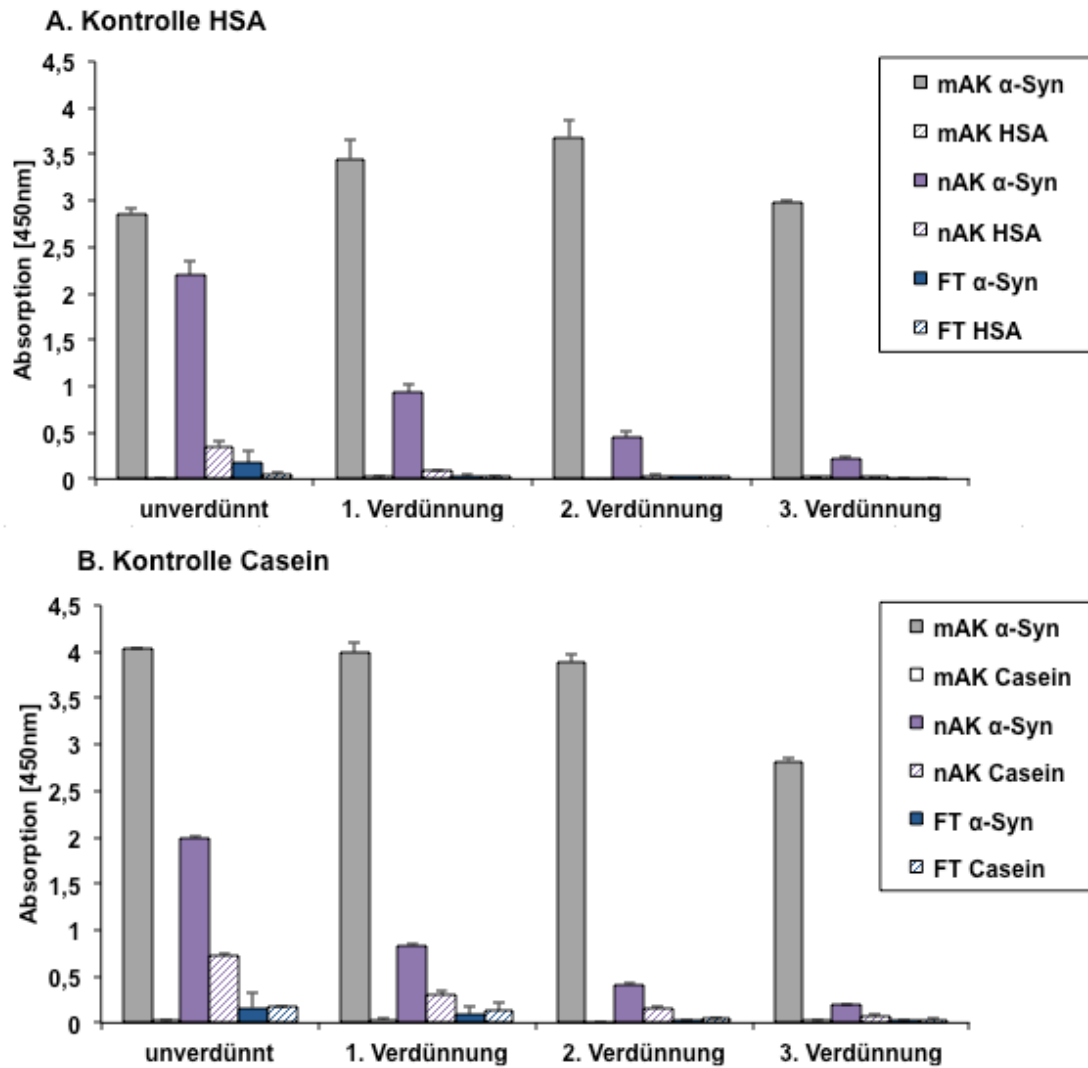


Abb. 4.18 Bindungsverhalten der Antikörper an HSA und Casein

α -Synuclein sowie zum Vergleich HSA bzw. Casein wurden in der Konzentration $1\mu\text{M}/\mu\text{L}$ auf eine ELISA-Platte gecoatet und mit nAK α -Syn, mAK α -Syn (α -Syn-Klon 211, Invitrogen) und FT in jeweils einer Verdünnungsreihe mit 3 1 : 1 Verdünnungsschritten inkubiert. **A. Bindungsverhalten an HSA.** **B. Bindungsverhalten an Casein.** Alle Ergebnisse sind angegeben als die bei 450nm gemessene Absorption und dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (STABW). Sie stammen aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit Zweifachbestimmung.

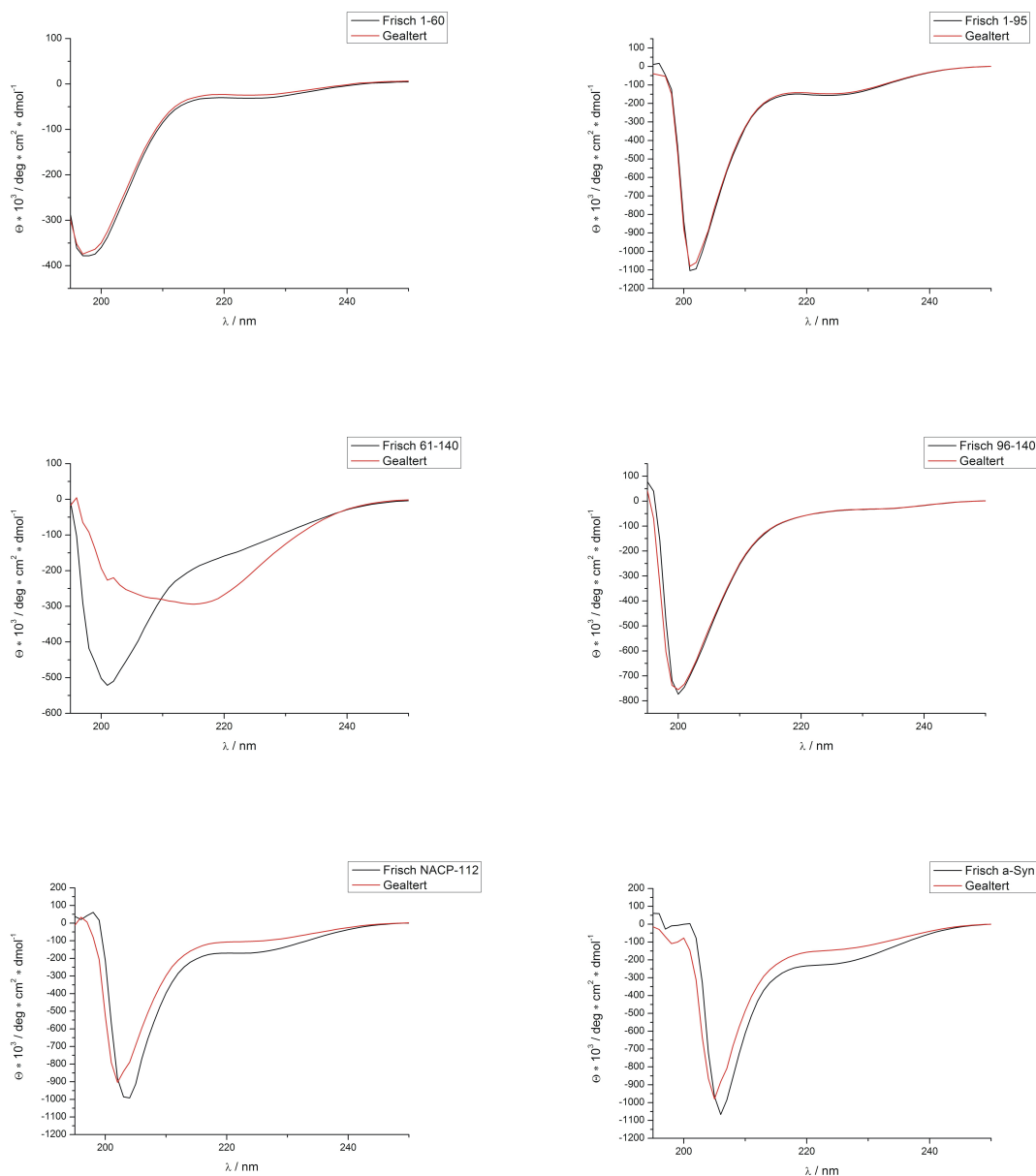
4.3.3 CD-Spektrometrie

In der Literatur wurden für verschiedene α -Synuclein-Fragmente durch den Alterungsprozess induzierte Konformationsänderungen beschrieben. In physiologischer Lösung ist α -Synuclein ungefaltet, es besitzt also keine spezifische Sekundärstruktur und liegt deshalb in random-coil-Konformation vor. Unter bestimmten Umständen kann es jedoch sowohl α -helikale- als auch β -sheet-Konformation annehmen (123). Mit der CD-Spektrometrie kann unterschieden werden, ob die Fragmente in α -helikaler-Form, β -sheet-Form oder random-coil-Konformation vorliegen. Die α -helikale-Form ist durch ein Maximum bei 192 nm und Minima bei 208 und 222 nm charakterisiert, die β -sheet-Form durch ein Maximum bei 195 nm sowie einem Minimum bei 218 nm. Bei der random-coil-Konformation findet sich ein Minimum bei 197 nm. Bislang konnte von verschiedenen Gruppen gezeigt werden, dass besonders die NAC-Region zur Ausbildung der β -sheet-Form neigte, was mit der Entwicklung von Toxizität verbunden war. Durch Alterung wurde dieser Prozess noch zusätzlich verstärkt (10, 41, 63, 107). Nun sollte untersucht werden, ob sich auch bei den hier verwendeten Fragmenten durch Alterung die Sekundärstruktur ändert. Dazu wurden CD-spektrometrische Messungen der frischen Fragmente in PBS sowie erneut nach 7 Tagen Alterung bei 37°C durchgeführt. Alle Fragmente lagen frisch angesetzt in random-coil-Struktur vor. Gealtert zeigte sich nur für Fragment 61-140 ein Übergang in die sogenannte β -sheet-Form. Die Fragmente 1-60, 1-95 sowie 96-140 wiesen weiterhin unverändert eine random coil-Struktur auf. Für α -Synuclein und α -Syn 112 war hingegen durch den Alterungsprozess eine leichte Zunahme der random-coil-Struktur zu beobachten. Gleichzeitig nahm die, vorher noch zusätzlich zum random-coil-Anteil bestehende, Mischung aus α -Helix- und β -sheet-Form ab.

Zu beachten ist, dass die CD-Spektrometrie nur Veränderungen der Amidbindungen erfasst. Bei Di- bzw. Trimerisierung der Proteine erfolgt keine Änderung der bestehenden Amidbindungen, dadurch lassen sich diese frühen Aggregationstendenzen nicht mittels CD-Spektroskopie erfassen. In MALDI-ToF-Messungen (nicht gezeigte Daten) ließ sich stichprobenartig eine verstärkte Ausbildung von Di- und Trimeren in den Proben der gealterten Fragmente zeigen. Dagegen lagen alle frischen Fragmente nur in monomorer Form vor.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der CD-spektrometrischen Messung-

en, dass sich nur bei Alterung des Fragments 61-140 die Sekundärstruktur verändert: Das frische Fragment 61-140 lag in random-coil- Konformation vor, das gealterte Fragment 61-140 jedoch überwiegend in der pathologischen β -sheet-Konformation. α -Synuclein und alle anderen α -Syn-Fragmente waren sowohl frisch als auch gealtert überwiegend in der physiologischen random-coil-Konformation vorzufinden (Abb. 4.19).



$c = 100 \mu\text{M}$ (PBS), $T = 21^\circ\text{C}$, $n = 10$; schwarz: frische, filtrierte Probe direkt nach dem Lösen, rot: nach Inkubation (7 Tage bei $T = 37^\circ\text{C}$).

Abb. 4.19 CD-Spektrometrische Darstellung der α -Syn-Fragmente

$100 \mu\text{M}$ α -Syn-Fragment-Lösung in 1x PBS wurde direkt nach dem Ansetzen bzw. nach 7 Tagen Alterung bei 37°C CD-spektrometrisch gemessen. Die Ergebnisse sind gezeigt in λ/nm , aus den Maxima und Minima der Kurve kann auf die zweidimensionale Konformation geschlossen werden. Fragment NACP 112 entspricht α -Synuclein 112. Versuche durchgeführt von Dipl. chem. Andreas Röder, AG Prof. Dr. A. Geyer, Institut für Chemie, Universität Marburg, abgebildet mit freundlicher Genehmigung.

4.4 Zellkultur

Ziel war es, die zytotoxischen und proinflammatorischen Eigenschaften der α -Syn-Fragmente an primären murinen kortikalen Neuronen sowie primären murinen Mikroglia auszutesten. Zudem sollte bestimmt werden, inwieweit durch Zugabe der nAK α -Syn Zellüberleben und Inflammation beeinflusst werden kann.

Für die Versuche wurden primäre Zellen gewählt, da an diesen besonders gut das Verhalten einzelner Zellarten untersucht werden kann. Zudem befindet man sich mit primären Zellen näher an der in-vivo-Situation als mit kultivierten Zelllinien.

4.4.1 Primäre murine kortikale Neurone

LDH-Assay

Anhand der enzymatischen Quantifizierung der Lactatdehydrogenase (LDH), die bei Zerstörung der Zytoplasmamembran aus der Zelle freigesetzt wird, kann durch photometrische Messung der LDH-Aktivität auf das Ausmaß des Zelluntergangs geschlossen werden.

Die primären kortikalen Neurone (PN) wurden dafür 48h mit frischen bzw. gealterten α -Synuclein und -Fragmenten (1 μ M und 10 μ M) inkubiert. Als Positivkontrollen wurden mit 1%igem Triton behandelte Zellen verwendet. Triton zerstört die Zellmembran vollständig und führt somit zu einer starken LDH-Ausschüttung. Im prozentualen Vergleich zur Positivkontrolle ließ sich bei Proben und unbehandelten Kontrollen keine signifikante LDH-Ausschüttung nachweisen. Weder frische (Abb. 4.20A) noch gealterte (Abb. 4.20B) Ansätze von α -Synuclein und den -Fragmenten führten daher zu einer direkten Zellschädigung. Auch zwischen den verschiedenen verwendeten Fragment-Konzentrationen ließ sich kein Unterschied in der LDH-Ausschüttung erkennen. Ebenso rief das verwendete Lösungsmittel (PBS) keine Zellschädigung hervor.

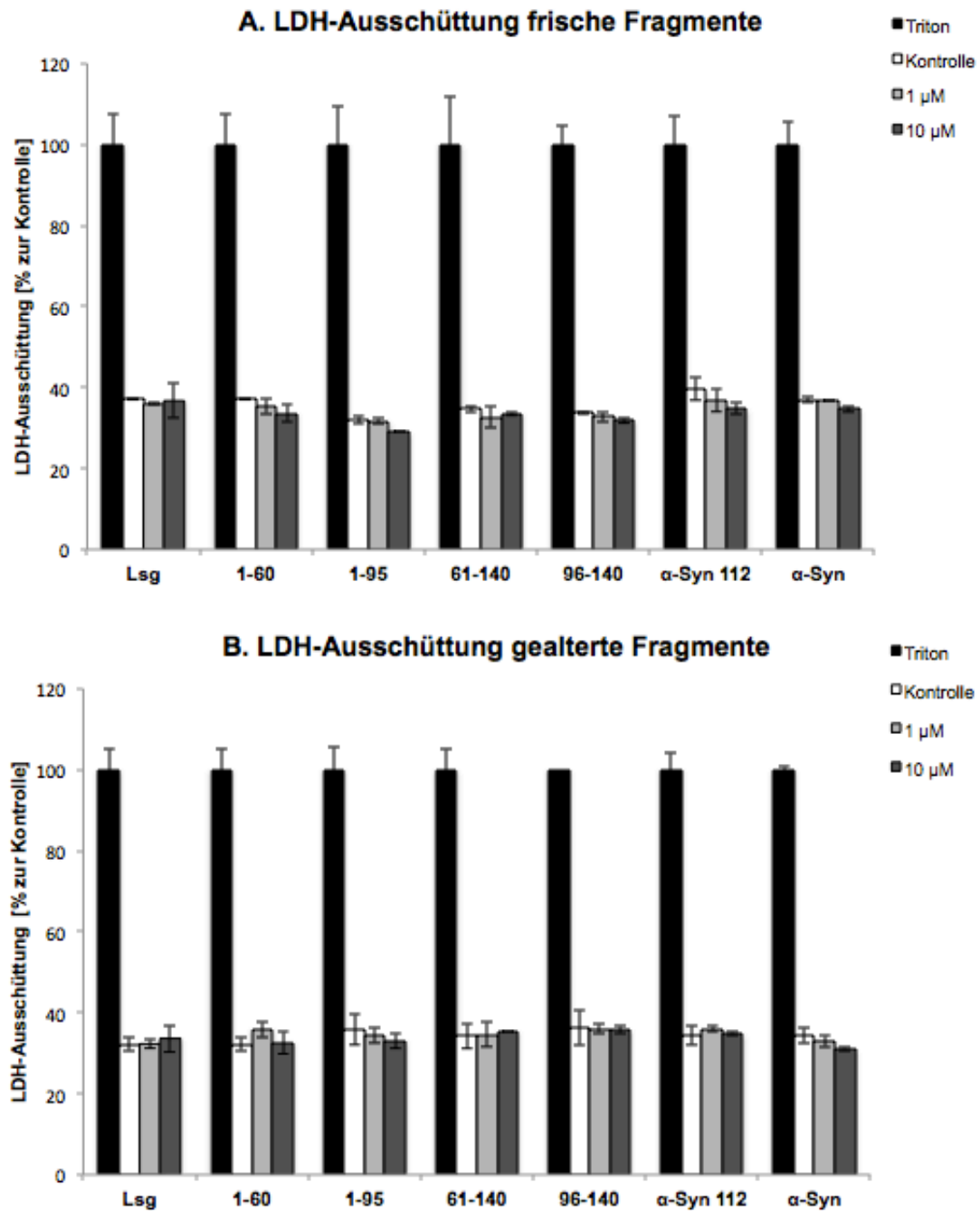


Abb. 4.20 Fragment-induzierte LDH-Ausschüttung primärer Neurone

Die primären Neurone wurden über einen Zeitraum von 48h mit 1 μ M bzw. 10 μ M der α -Syn Fragmente sowie einer PBS-Lösungskontrolle (Lsg) inkubiert (**A.** frisch angesetzt bzw. **B.** 7 Tage bei 37°C gealtert). Anschließend wurde die Zellschädigung mittels LDH-Assay bestimmt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Die Ergebnisse sind angegeben als prozentuale Absorption im Vergleich zu mit 1%igem Triton behandelten Zellen (Triton) und dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (STABW). Sie stammen aus jeweils einem Versuch mit Dreifachbestimmung.

MTT-Assay

Im Gegensatz zum LDH-Test misst der MTT-Test die Zellvitalität über den Nachweis mitochondrialer Reduktionsäquivalente. Damit ist er ein Maß für die mitochondriale Integrität. Gemessen wird photometrisch der Umsatz der Reduktionsäquivalente. Je höher dieser ist, desto vitaler die Zelle.

Ausgehend von in der Literatur gefundenen Angaben (10, 41) wurde eine Inkubationszeit von 48h gewählt. Frisches und gealtertes α -Synuclein wurden in den Konzentrationen 1 μ M und 10 μ M auf den Zellen inkubiert. Die mit frischem α -Synuclein und -Fragmenten behandelten Zellen zeigten nur für die Fragmente 1-95 und 61-140 eine signifikante Reduktion der Zellvitalität im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 4.1, Abb. 4.21A). Die gealterten Fragmente 1-95, 61-140 und α -Syn 112 senkten signifikant die Zellvitalität (Tab. 4.1, Abb. 4.21B). Dagegen beeinflusste weder frisches noch gealtertes α -Synuclein die Vitalität. Insgesamt zeigte sich, dass 61-140 das zellschädigendste Fragment war, da es bereits in frischer Zubereitung und in niedriger Konzentration die Zellvitalität beeinflusste. Durch den Alterungsvorgang wurde zum einen das Fragment α -Syn 112 zellschädigend, zum anderen führten die bereits frisch zellschädigenden Fragmente 1-95 und 61-140 zu einer etwa 20% stärkeren Reduktion der Zellvitalität (von 72,0% \pm 0,6 für frisches 1-95 [10 μ M] auf 50,7% \pm 2,7 für gealtertes 1-95 bzw. von 70,0% \pm 0,3 für frisches 61-140 [10 μ M] auf 43,0% \pm 14,0 für gealtertes 61-140). Das verwendete Lösungsmittel (PBS) alleine führte zu keiner Beeinflussung der Zellvitalität.

| Vitalität | frisch | gealtert |
|---------------------|---|--|
| α -Synuclein | - | - |
| 1-60 | - | - |
| 1-95 | 72,0% \pm 0,6 (10 μ M) ** | 50,7% \pm 2,7 (10 μ M) ** |
| 61-140 | 81,1% \pm 2,3 (1 μ M) ** 70,0% \pm 0,3 (10 μ M) ** | 50,7% \pm 3,2 (1 μ M) ** 43,0% \pm 14,0 (10 μ M) ** |
| 96-140 | - | - |
| α -Syn 112 | - | 80,1% \pm 1,6 (1 μ M) * 57,3% \pm 1,3 (10 μ M) ** |

Tab. 4.1 Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion primärer Neurone.

α -Syn Fragment-Lösung frisch: frisch angesetzt bzw. gealtert: 7 Tage bei 37°C gealtert.

Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung (STABW). Die statistische Auswertung erfolgte mittels *t*-Test, signifikante Unterschiede sind dargestellt als * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$).

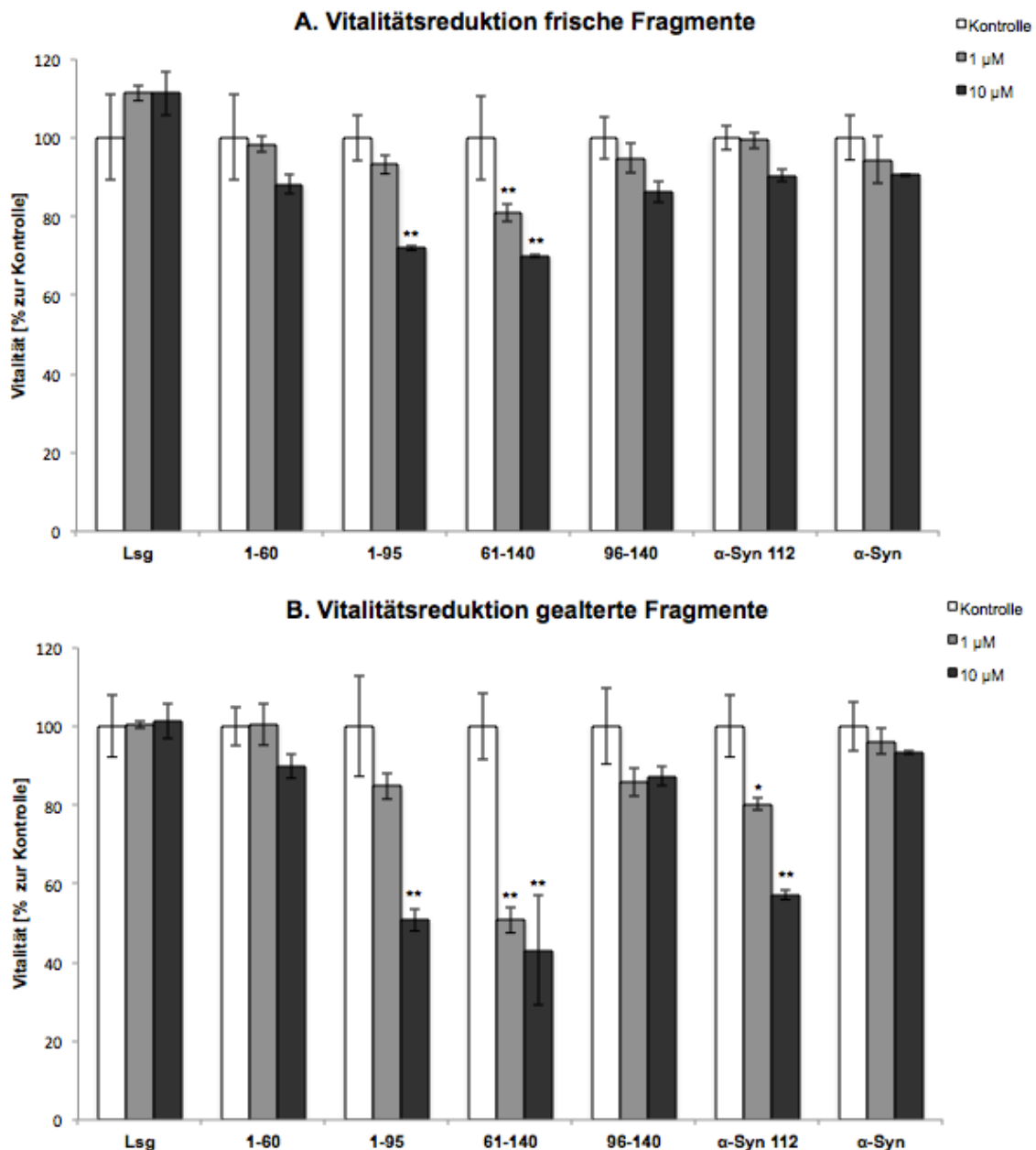


Abb. 4.21 Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion primärer Neurone

Die primären Neurone wurden für 48h mit 1 µM bzw. 10 µM der frischen (A.) oder gealterten (B.) α-Syn-Fragmenten und einer PBS-Lösungskontrolle (Lsg) inkubiert, anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Assay bestimmt. Die Ergebnisse sind als prozentuale Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle angegeben und dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung (STABW). Sie stammen aus jeweils einem Experiment mit Zweifach- und Dreifachbestimmung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *t*-Test, signifikante Unterschiede sind dargestellt als * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$).

MTT mit nAK α-Syn

Ausgehend von der nachgewiesenen signifikanten Zellvitalitätsreduktion einiger Fragmente sollte nun untersucht werden, inwieweit diese durch die nAK α-Syn beeinflusst werden kann. Dies wurde nur mit gealterten Fragmenten getestet, da sich diese als erheblich toxischer erwiesen hatten.

Als Fragmentkonzentration wurde 10 μM gewählt, da sich hier gegenüber der niedrigeren Konzentration von 1 μM eine deutlichere Vitalitätsreduktion gezeigt hatte. Zuerst wurde der Einfluss von nAK α -Syn und FT auf primäre kortikale Neuronen getestet. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass diese alleine zu einer Zellschädigung führen können.

Die Zellen wurden für 48h mit nAK α -Syn bzw. FT in den Konzentrationen 5, 10, 20 und 50 μM inkubiert. Es zeigten sich, selbst in hohen AK-Konzentrationen, keine Auswirkungen auf die Zellvitalität (Abb. 4.22).

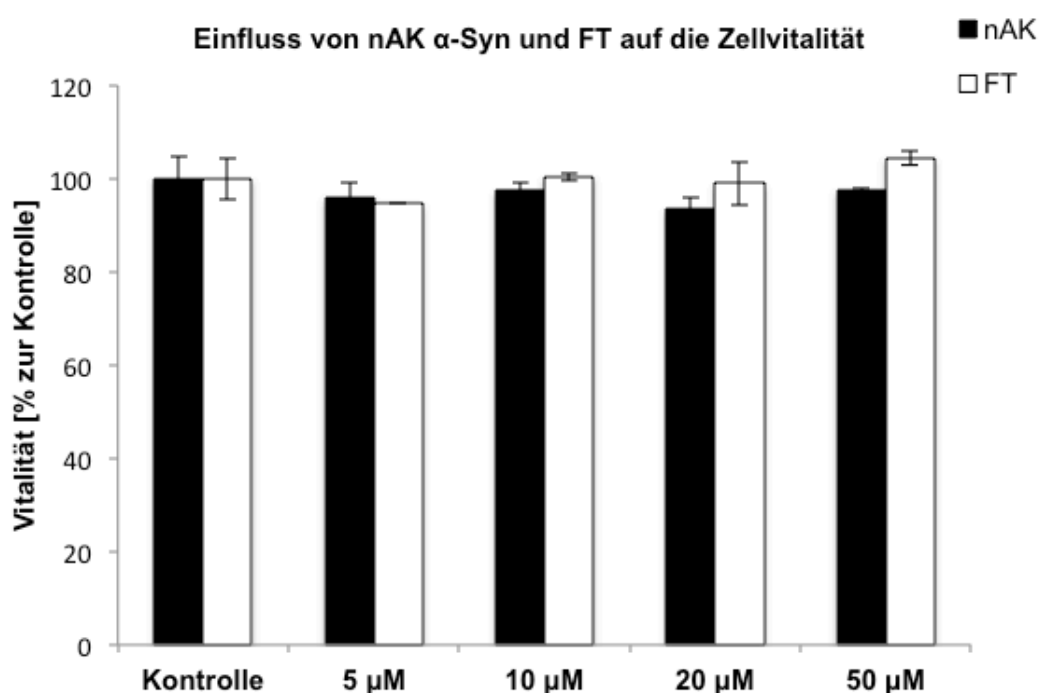


Abb. 4.22 Einfluss von nAK α -Syn und FT auf die Zellvitalität primärer Neurone

Die primären Neurone wurden für 48h mit 5, 10, 20 und 50 μM von nAK α -Syn bzw. FT inkubiert, anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Assay bestimmt. Die Ergebnisse sind angegeben als prozentuale Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (STABW).

Anschließend wurden die nAK α -Syn in Verbindung mit den Fragmenten getestet. Dazu wurden 700 nM der nAK α -Syn bzw. des FT (diese Konzentration wurde anhand von Literaturangaben ähnlicher Versuche mit nAK A β gewählt (16)) mit jeweils 10 μM der Fragmente für 1h in zuvor entnommenen Zellmedium vorinkubiert. Dann wurde beides für 48h mit den primären kortikalen Neuronen inkubiert. Es zeigte sich, wie schon im Vorversuch, nur für die Fragmente 1-95, 61-140 und α -Syn 112 eine signifikante Vitalitätsreduktion. Durch

Zugabe der nAK α -Syn konnte diese für zwei der zellschädigenden Fragmente, nämlich 1-95 und α -Syn 112, aufgehoben (von $76,2\% \pm 3,2$ auf $129,4\% \pm 2,8$ [1-95]) bzw. reduziert werden (von $68,0\% \pm 2,5$ auf $90,2\% \pm 1,0$ [α -Syn 112]). Die Zugabe des FT bewirkte jedoch eine ähnliche Vitalitätssteigerung: von $76,2\% \pm 3,2$ auf $148,0\% \pm 18,0$ [1-95] und von $68,0\% \pm 2,5$ auf $90,2\% \pm 1,0$ [α -Syn 112] (Tab. 2). Zwischen den durch nAK α -Syn und FT induzierten Effekten gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Im Falle des Fragments 61-140 konnte die Vitalitätsreduktion nicht im statistisch relevanten Ausmaß beeinflusst werden (von $77,9\% \pm 1,3$ auf $75,1\% \pm 0,8$ [nAK α -Syn] bzw. $83,3\% \pm 0,9$ [FT]). Dies lässt vermuten, dass die Zugabe von Antikörpern einen unspezifischen Schutzeffekt gegen die Fragmente 1-95 und α -Syn 112 erzeugt (Tab. 3, Übersicht Abb. 4.23, detaillierte Darstellung Abb. 4.24A + B).

Tab. 4.2 Einfluss der nAK α -Syn auf die Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion PN

| Vitalität | Fragment | Fragment + FT | Fragment + nAK α -Syn |
|-------------------|---------------------|----------------------------------|------------------------------|
| 1-60 | - | - | $80,0\% \pm 0,6$ * |
| 1-95 | $76,2\% \pm 3,2$ ** | $148,0\% \pm 18,0$ ** | $129,4\% \pm 2,8$ ** |
| 61-140 | $77,9\% \pm 1,3$ ** | $83,3\% \pm 0,9$ ** | $75,1\% \pm 0,8$ ** |
| 96-140 | - | - | - |
| α -Syn 112 | $68,0\% \pm 2,5$ ** | $92,7\% \pm 4,2$ ^{n.s.} | $90,2\% \pm 1,0$ * |

Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung (STABW). Als Ausgangswert wurden die Zellen nur mit dem Fragment behandelt (Fragment). Die nAK α -Syn wurden vor Zugabe zu den primären Neuronen mit den α -Syn-Fragmenten vorinkubiert (Fragment + nAK α -Syn). Der FT wurde als Kontroll-AK verwendet (Fragment + FT). Die statistische Auswertung erfolgte mittels *t*-Test, signifikante Unterschiede sind dargestellt als * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$). n.s.: statistisch kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

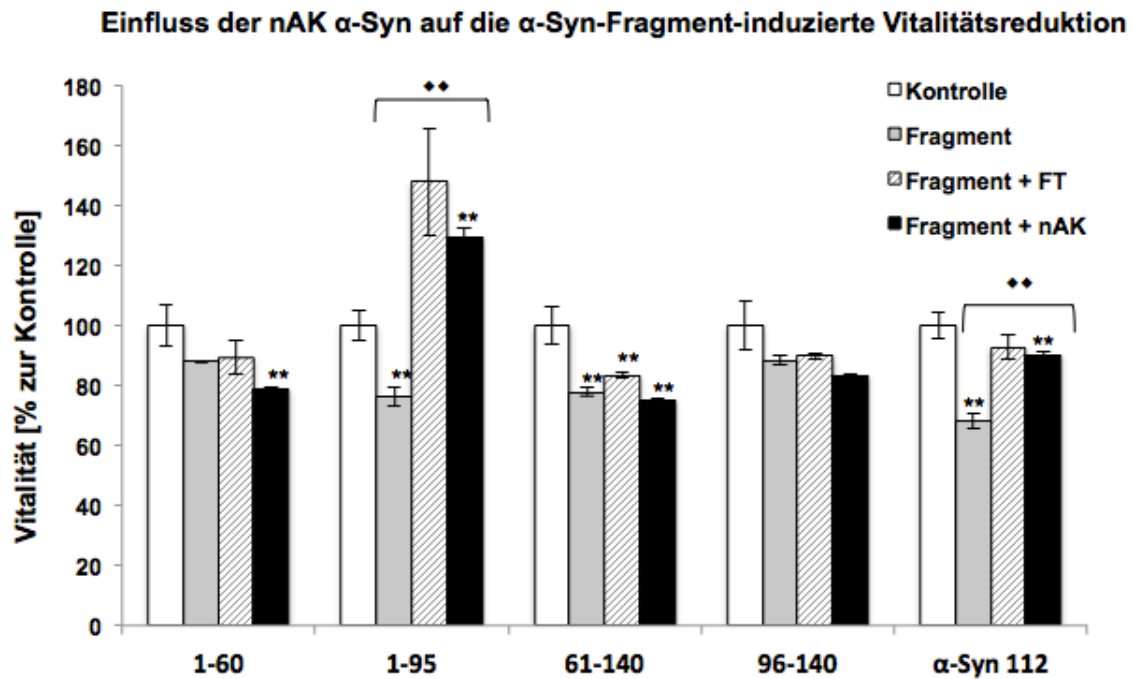


Abb. 4.23 Einfluss der nAK α -Syn auf die Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion
 (Übersicht) 10 μ M der Fragmente wurden für 1h mit 700 nM der nAK α -Syn (Fragment + nAK) bzw. FT (Fragment + FT) vorinkubiert, anschließend wurde beides auf die primären Neurone gegeben und für 48h inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Fragmente auch alleine auf den Zellen inkubiert (Fragment). Die Zellvitalität wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Die Ergebnisse sind angegeben als prozentuale Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (STABW). Sie stammen aus drei unabhängig voneinander wiederholten Experimenten mit Zweifachbestimmung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *t*-Test, signifikante Unterschiede sind für den Vergleich zur Kontrolle dargestellt als * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$), für den Vergleich zu den Fragmenten als ◆ ($p < 0,05$) und ◆◆ ($p < 0,01$).

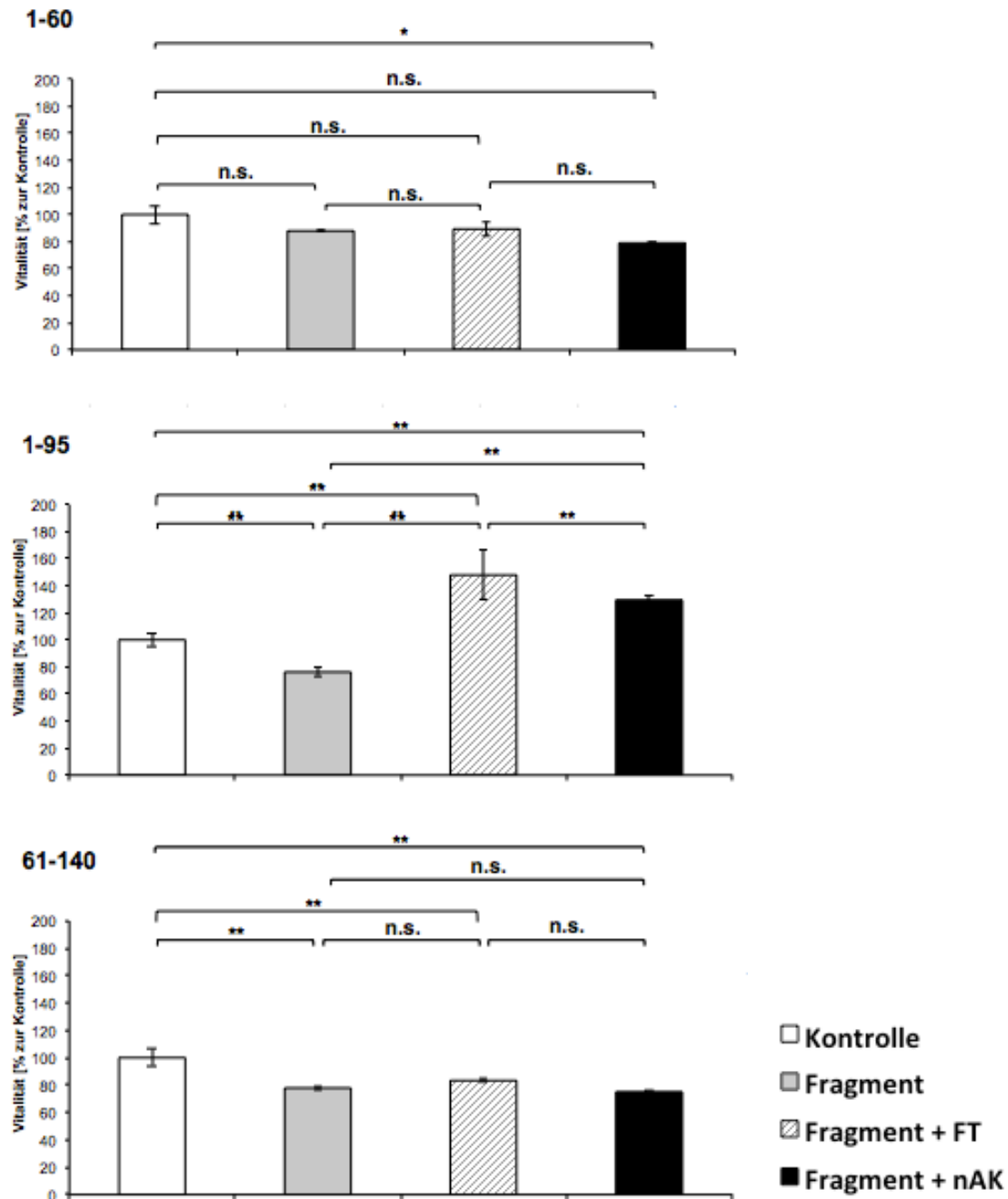


Abb. 4.24A Einfluss der nAK α -Syn auf die Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion

(detaillierte Darstellung) 10 μ M der Fragmente wurden für 1h mit 700 nM der nAK α -Syn (Fragment + nAK) bzw. FT (Fragment + FT) vorinkubiert, anschließend wurde beides auf die primären Neurone gegeben und für 48h inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Fragmente auch alleine auf den Zellen inkubiert (Fragment). Die Zellvitalität wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Die Ergebnisse sind angegeben als prozentuale Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (STABW). Sie stammen aus drei unabhängig voneinander wiederholten Experimenten mit Zweifachbestimmung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *t*-Test, signifikante Unterschiede sind für dargestellt als * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$). n.s.: statistisch kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

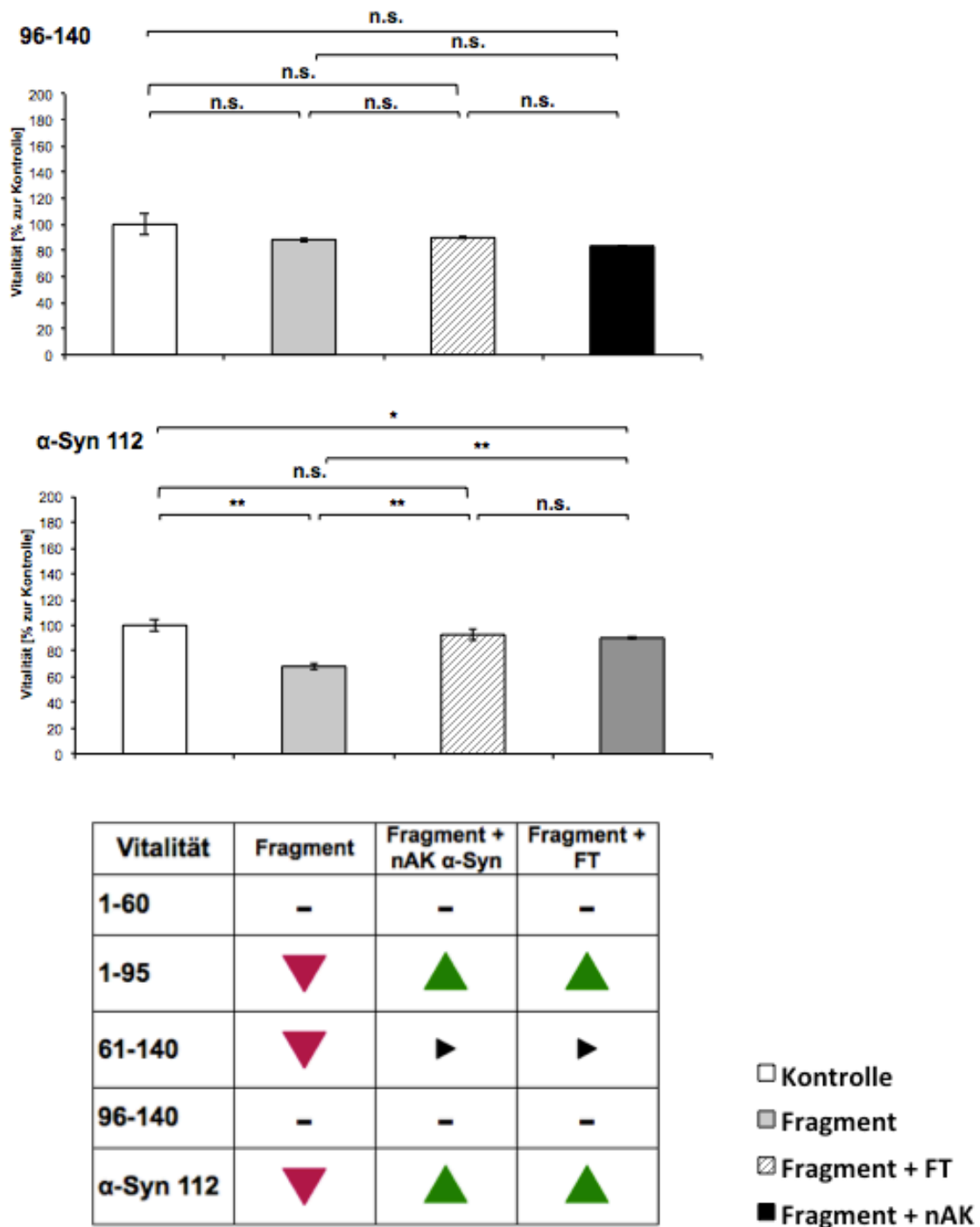


Abb. 4.24B Einfluss der nAK α -Syn auf die Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion

(detaillierte Darstellung) 10 μ M der Fragmente wurden für 1h mit 700 nM der nAK α -Syn (Fragment + nAK) bzw. FT (Fragment + FT) vorinkubiert, anschließend wurde beides auf die primären Neurone gegeben und für 48h inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Fragmente auch alleine auf den Zellen inkubiert (Fragment). Die Zellvitalität wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Die Ergebnisse sind angegeben als prozentuale Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (STABW). Sie stammen aus drei unabhängig voneinander wiederholten Experimenten mit Zweifachbestimmung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *t*-Test, signifikante Unterschiede sind für dargestellt als * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$). n.s.: statistisch kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Die Veränderungen wurden in einer Tabelle schematisch mit roten Pfeilen (Vitalitätsreduktion durch Fragmente), grünen Pfeilen (Vitalitätssteigerung durch Koinkubation mit nAK/FT) und schwarzen Pfeilen (kein Einfluss von nAK/FT) dargestellt.

4.4.2 Primäre murine Mikroglia

MTT-Assay

Analog zum Vorgehen bei den primären kortikalen Neuronen wurden auch auf primären Mikroglia (PM) zuerst die Auswirkungen der Fragmente auf die Zellvi-
talität getestet. Auf die Durchführung eines LDH-Assays wurde hier verzichtet,
da dieser bereits bei den primären kortikalen Neuronen keine α -Syn-Fragment-
induzierte Erhöhung der Zellmortalität zeigte. Auch hier wurden, ausgehend von
in der Literatur gefundenen Angaben, eine Inkubationszeit von 48h gewählt
sowie Konzentrationen von 1 μ M und 10 μ M für frische bzw. gealterte
Fragmente.

Eine signifikante Vitalitätsreduktion im Vergleich zur Kontrolle fand sich nur für
das Fragment 61-140. Diese bestand unabhängig von Konzentration und
Alterungszustand (frisch: 56,0% \pm 4,1 [1 μ M], 54,0% \pm 2,7 [10 μ M]; gealtert:
63,7% \pm 0,5 [1 μ M], 56,1% \pm 0,4 [10 μ M]). Das verwendete Lösungsmittel
(PBS) führte zu keiner Vitalitätsreduktion (Tab. 4.3, Abb. 4.25).

| Vitalität | frisch | gealtert |
|-------------------|---|---|
| 1-60 | - | - |
| 1-95 | - | - |
| 61-140 | 56,0% \pm 4,1 (1 μ M) ** 54,0% \pm 2,7 (10 μ M) ** | 63,7% \pm 0,5 (1 μ M) * 56,1% \pm 0,4 (10 μ M) * |
| 96-140 | - | - |
| α -Syn 112 | - | - |

Tab. 4.3 Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion PM

α -Syn Fragment-Lösung frisch: frisch angesetzt bzw. gealtert: 7 Tage bei 37°C gealtert.
Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung im Vergleich zur Kontrolle. Die
statistische Auswertung erfolgte mittels *t*-Test, signifikante Unterschiede sind dargestellt als *
(*p*<0,05) und ** (*p*<0,01).

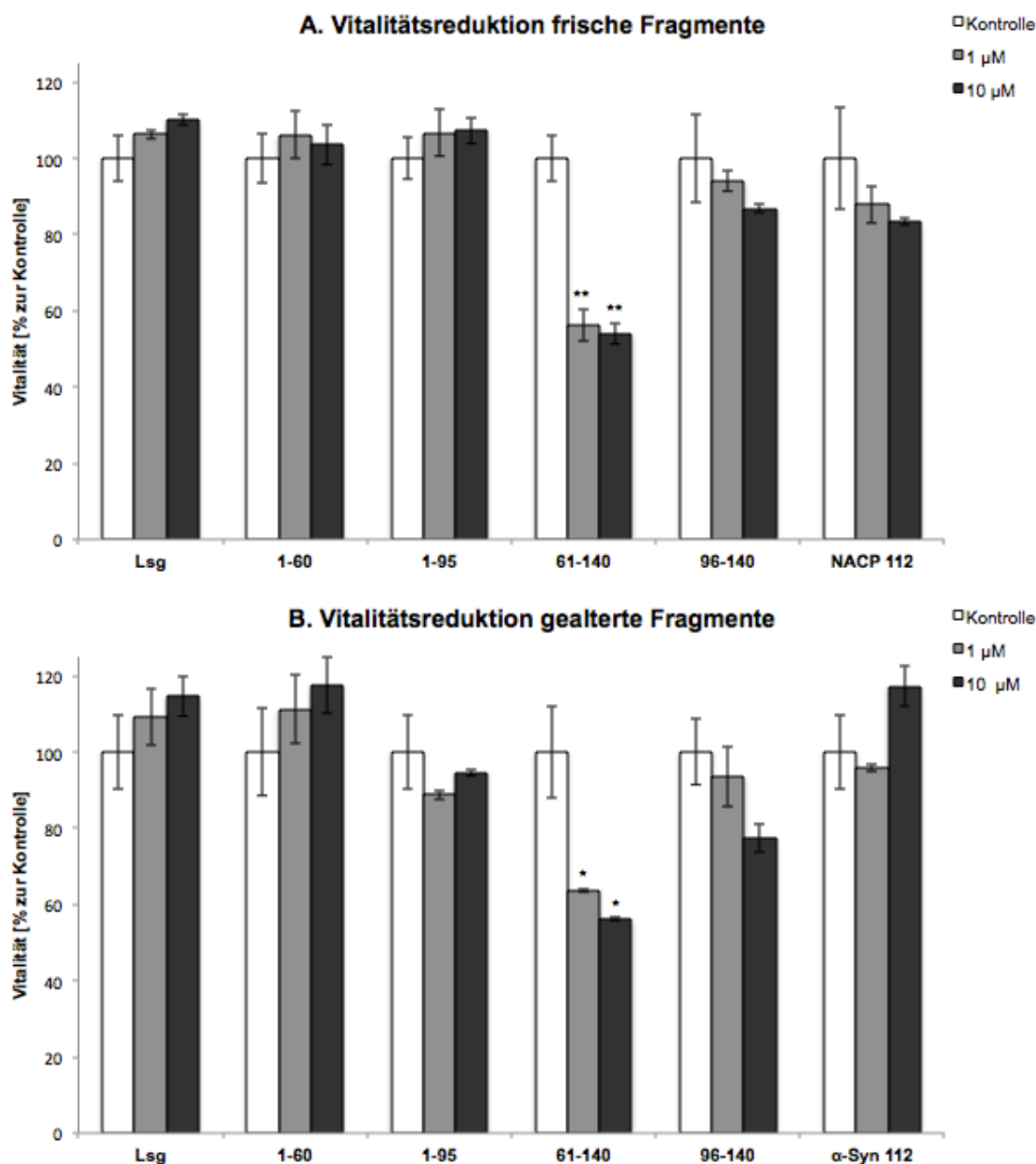


Abb. 4.25 Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion primärer Mikroglia

Primäre Mikroglia wurden für 48h mit 1 µM bzw. 10 µM der frischen oder gealterten Fragmente sowie einer PBS-Lösungskontrolle (Lsg) inkubiert, anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Assay bestimmt. Die Ergebnisse sind angegeben als prozentuale Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung (STABW). Sie stammen aus jeweils einem Experiment mit Zweifach- und Dreifachbestimmung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *t*-Test, signifikante Unterschiede sind dargestellt als * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$).

MTT mit nAK α-Syn

Auch hier wurde, ausgehend von den Ergebnissen der durchgeführten MTT-Assays, der Einfluss der nAK α-Syn nur auf gealterte Fragmente getestet: Zum einen hatte sich in den Vortests kein deutlicher Unterschied zwischen frischen und gealterten Fragmenten gezeigt. Zum anderen waren gealterte Fragmente

deutlich zellschädigender auf primäre Neuronen. Für primäre Mikroglia sollte daher ein vergleichbares Vorgehen gewählt werden.

Als Fragmentkonzentration wurde 1 μ M genommen, da diese Konzentration in den Vorversuchen bereits zu einer erheblichen Vitalitätsreduktion auf primärer Mikroglia geführt hatte.

Es wurden 200 nM der nAK α -Syn bzw. des FT (diese Konzentration wurde anhand von Literaturangaben ähnlicher Versuche mit nAK A β gewählt (16)) mit jeweils 1 μ M der Fragmente für 1h in zuvor entnommenen Zellmedium vorinkubiert. Dann wurde beides für 48h auf den primären Mikroglia inkubiert. Als Kontrollen wurden nAK α -Syn und FT auch jeweils einzeln auf den Zellen inkubiert.

Die Fragmente 1-95, 61-140 und α -Syn 112 führten zu einer signifikanten Vitalitätsreduktion der primären Mikroglia (siehe Tab. 4.4). Im Gegensatz zum Vorversuch, in dem 61-140 als einziges Fragment zellschädigend war, erwiesen sich nun auch die Fragmente 1-95 und α -Syn 112 als zellschädigend. Die α -Syn-Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion konnte jedoch weder durch nAK α -Syn noch FT beeinflusst werden. Einzeln zeigten nAK α -Syn und FT keinen Einfluss auf die Zellvitalität der primären Mikroglia (Abb. 4.26).

| Vitalität | Fragment | Fragment + FT | Fragment + nAK α -Syn |
|-------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|
| 1-60 | - | - | - |
| 1-95 | 83,7% \pm 3,5 * | 83,0% \pm 4,6 * | 83,0% \pm 0,9 * |
| 61-140 | 72,5% \pm 1,5 ** | 70,6% \pm 4,4 ** | 70,5% \pm 6,4 ** |
| 96-140 | - | - | - |
| α -Syn 112 | 76,6% \pm 2,4 * | 78,8% \pm 4,8 * | 74,7% \pm 7,5 * |

Tab. 4.4 Einfluss der nAK α -Syn auf Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion PM

Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung (STABW). Als Ausgangswert wurden die Zellen nur mit dem Fragment behandelt (Fragment). Die nAK α -Syn wurden vor Zugabe zu den primären Mikroglia mit den α -Syn-Fragmenten vorinkubiert (Fragment + nAK α -Syn). Der FT wurde als Kontroll-AK verwendet (Fragment + FT). Die statistische Auswertung erfolgte mittels *t*-Test, signifikante Unterschiede sind dargestellt als * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$).

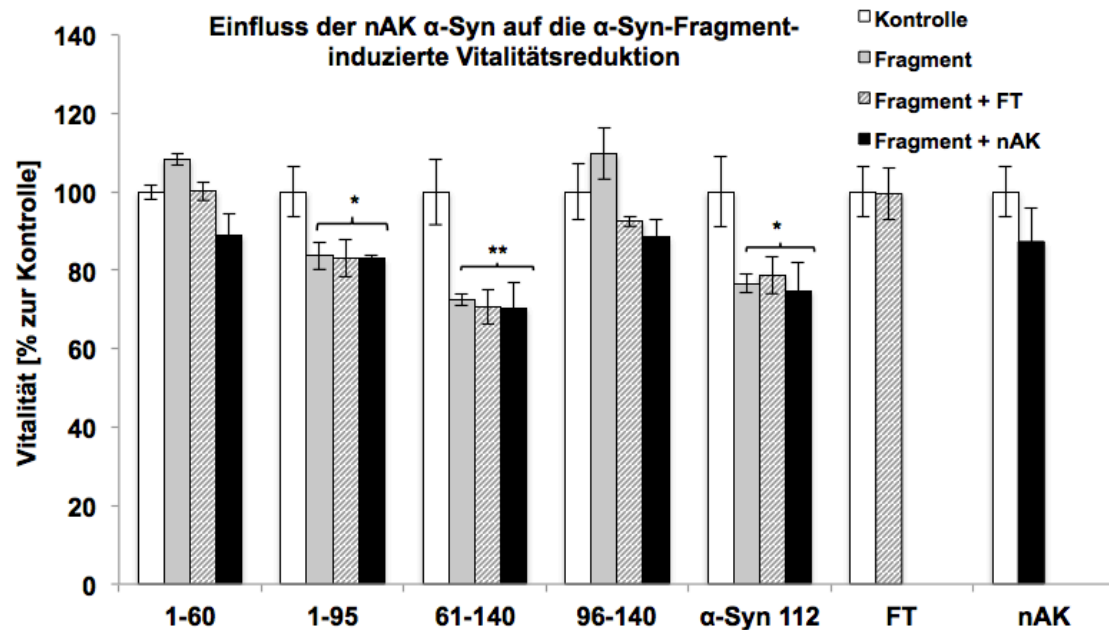


Abb. 4.26 Einfluss der nAK α -Syn auf die Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion

1 μ M der Fragmente wurden für 1h mit 200 nM der nAK α -Syn (Fragment + nAK) bzw. FT (Fragment + FT) vorinkubiert, anschließend wurde beides auf die primären Mikroglia gegeben und für 48h inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Fragmente auch alleine auf den Zellen inkubiert (Fragment). Die Zellvitalität wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Die Ergebnisse sind angegeben als prozentuale Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (STABW). Sie stammen aus drei unabhängig voneinander wiederholten Experimenten mit Zweifachbestimmung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t -Test, signifikante Unterschiede sind für den Vergleich zur Kontrolle dargestellt als * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$).

4.5 Zytokin-ELISA

4.5.1 Fragment-induzierte Zytokinausschüttung

Eine weitere Fragestellung war, ob 1) α -Synuclein-Fragmente eine proinflammatorische Antwort auf primären Mikroglia induzieren und 2) inwieweit dieser durch die nAK α -Syn entgegengewirkt werden kann. Dazu wurde die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6 gemessen. Dabei wurden die Zellen jeweils 24h mit 1 bzw. 10 μ M des jeweiligen Fragments inkubiert und anschließend die Zytokinkonzentration im Zellmedium bestimmt. Vergleichsweise wurde auch die Zytokinkonzentration nach 48h ermittelt (nicht gezeigte Daten). Diese war ähnlich verteilt wie nach 24 Stunden, jedoch bereits schwächer ausgeprägt. Deshalb wurde für weitere Versuche auf deren Bestimmung verzichtet.

TNF α -Ausschüttung:

Bereits die frischen Fragmente führten alle zu einer signifikanten TNF α -Ausschüttung, allerdings gab es konzentrationsabhängige Unterschiede: 1-60 (nur bei 10 μ M), 1-95, 61-140, 96-140 und α -Syn 112 (jeweils bei 1 + 10 μ M). Auch die gealterten Fragmente führten bis auf 1-60 (1 μ M) alle zur TNF α -Ausschüttung. Die TNF α -Ausschüttung war konzentrationsabhängig bei 10 μ M ausgeprägter als bei 1 μ M. Eine genaue Quantifizierung der TNF α -Konzentration war nicht möglich, da v.a. bei den gealterten Fragmenten mehrfach das Absorptionsmaximum des verwendeten Standards überschritten wurde, so dass die Werte nur annähernd mit der höchsten Standardkonzentration angegeben werden konnten (Abb. 4.27). Das verwendete Lösungsmittel (PBS) löste alleine keine signifikante TNF α -Ausschüttung aus.

IL-6-Ausschüttung:

Auch hier führten die frischen Fragmente alle zu einer signifikanten IL-6-Ausschüttung, sowohl in niedriger als auch höherer Konzentration. Auch die gealterten Fragmente führten, bis auf 1-60 bei einer Konzentration von 1 μ M, alle zur IL-6-Ausschüttung. Die IL-6-Ausschüttung war hier ebenfalls konzentrationsabhängig bei 10 μ M ausgeprägter als bei 1 μ M. Eine genaue Quantifizierung der IL-6-Konzentration war nicht möglich, da v.a. bei den gealterten Fragmenten mehrfach das Absorptionsmaximum des verwendeten Standards

überschritten wurde, so dass die Werte nur annähernd mit der höchsten Standardkonzentration angegeben werden konnten (Abb. 4.28) Das verwendete Lösungsmittel (PBS) rief alleine keine signifikante IL-6-Ausschüttung hervor.

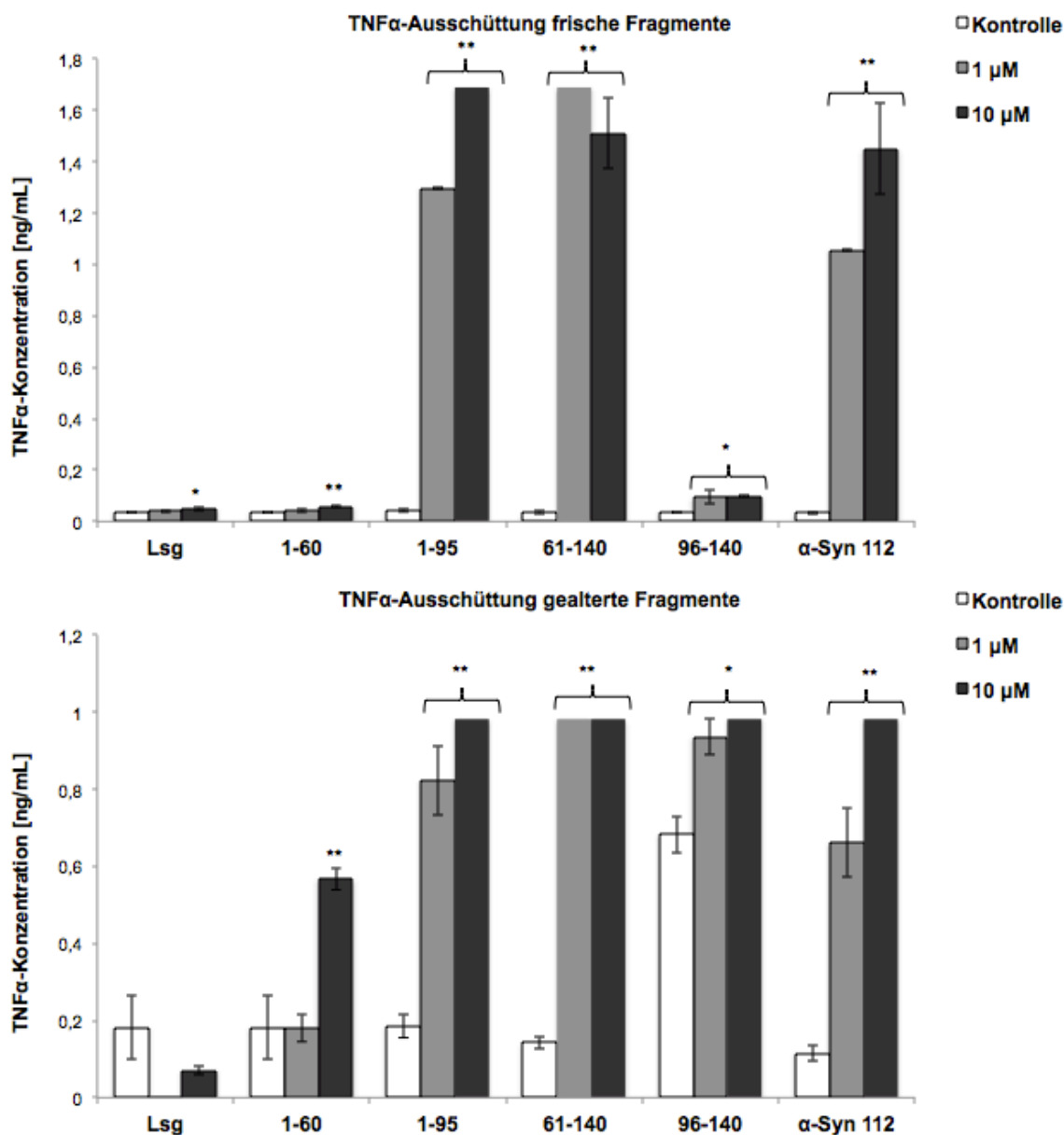


Abb. 4.27 Fragment-induzierte TNFα-Ausschüttung

Die Zellen wurden für 24h mit 1 bzw. 10 μM der Fragmente und einer PBS-Lösungskontrolle (Lsg) stimuliert, anschließend wurde die Ausschüttung von TNFα im Kulturmedium anhand der Absorption im ELISA quantifiziert. Die Kontrolle stellten unbehandelte Zellen dar. Die Ergebnisse sind angegeben als anhand einer Standardkurve berechnete Konzentration in ng/mL und dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung (STABW). Sie stammen aus jeweils einem Experiment mit Zweifachbestimmung. Mit unumrandeten Balken wurden Werte versehen, deren Absorption im ELISA über dem höchsten Wert der Standardkurve lag. Dargestellt wurde für diese der Wert der höchsten Standardkonzentration (unumrandet). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test, signifikante Unterschiede sind für den Vergleich zur Kontrolle dargestellt als * ($p < 0,01$) und ** ($p < 0,001$).

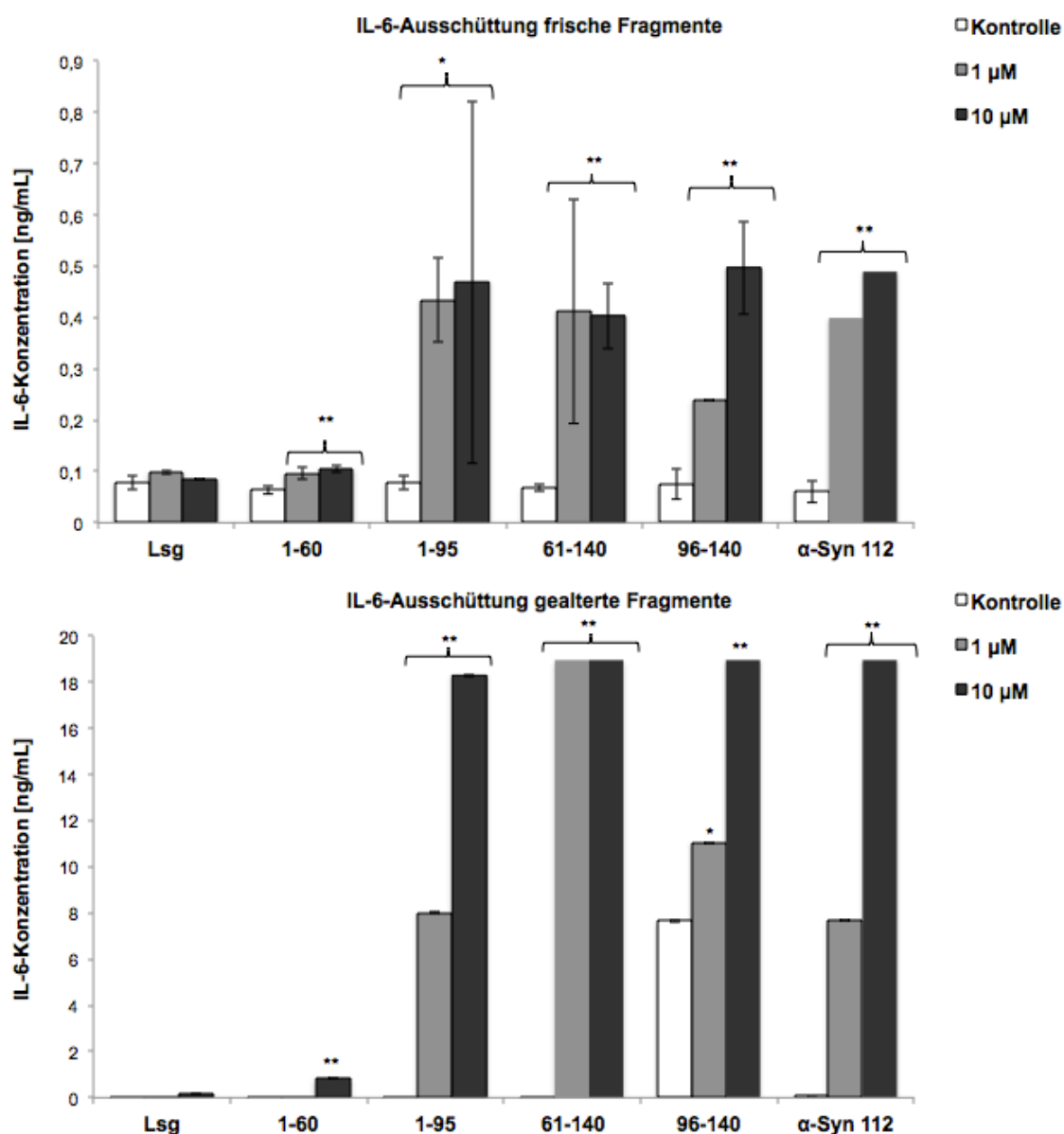


Abb. 4.28 Fragment-induzierte IL-6-Ausschüttung

Die Zellen wurden für 24h mit 1 bzw. 10 µM der Fragmente sowie einer PBS-Lösungskontrolle (Lsg) stimuliert, anschließend wurde die Ausschüttung von IL-6 im Kulturmedium anhand der Absorption im ELISA quantifiziert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen gewählt. Die Ergebnisse sind angegeben als anhand einer Standardkurve berechnete Konzentration in ng/mL und dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung (STABW). Sie stammen jeweils aus Zweifachbestimmungen. Mit unumrandeten Balken wurden Werte versehen, deren Absorption im ELISA über dem höchsten Wert der Standardkurve lag. Dargestellt wurde für diese der Wert der höchsten Standardkonzentration (unumrandet). Die statistische Auswertung erfolgte mittels *t*-Test, signifikante Unterschiede sind für den Vergleich zur Kontrolle dargestellt als * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,001$).

4.5.2 Zytokin-ELISAs mit nAK α-Syn

Da sich in den erfolgten Tests eine deutliche Induzierung der TNFα- und IL-6-Ausschüttung gezeigt hatte, sollte nun in einem weiteren Schritt der Einfluss der nAK α-Syn auf die Zellinflammation getestet werden.

Dazu wurden Fragmentkonzentrationen von 1 μ M verwendet, da sich hier bereits eine deutliche Zytokinausschüttung gezeigt hatte. Analog zu den MTT-Assays mit den nAK α -Syn wurden auch hier gealterte Fragmente verwendet. Diese hatten bei den Vortests zu einer stärkeren Zytokinausschüttung geführt. Es wurden 200 nM der nAK α -Syn bzw. des FT mit jeweils 1 μ M der gealterten Fragmente für 1h in zuvor entnommenem Zellmedium vorinkubiert. Dann wurde beides für 24h mit den primären Mikroglia inkubiert und anschließend die Zytokinkonzentration im Zellmedium bestimmt. Als Kontrollen wurden nAK α -Syn und FT auch jeweils einzeln mit den Zellen inkubiert.

TNF α :

Alle Fragmente führten zu einer im Vergleich zur Kontrolle signifikanten TNF α -Ausschüttung. Einzeln beeinflussten weder nAK α -Syn noch FT die TNF α -Konzentration im Zellmedium. Nach Vorinkubation mit den Fragmenten führten die nAK α -Syn bei allen Fragmenten, bis auf Fragment 61-140, zu einer signifikanten Reduktion der TNF α -Ausschüttung. Hingegen konnte durch Vorinkubation mit dem FT die TNF α -Ausschüttung bei keinem der Fragmente in statistisch signifikantem Ausmaß gesenkt werden, bei manchen Fragmenten stieg die TNF α -Konzentration in diesem Fall sogar an (Abb. 4.29).

IL-6:

Bis auf 1-60 führten auch hier alle Fragmente zu einer im Vergleich zur Kontrolle signifikanten IL-6-Ausschüttung. Die IL-6-Konzentration im Zellmedium wurde nicht durch nAK α -Syn oder FT alleine beeinflusst. Nach Vorinkubation mit den Fragmenten führten die nAK α -Syn bei allen IL-6-Ausschüttung-induzierenden Fragmenten zu einer signifikanten Reduktion derselben. Auch hier konnte durch Vorinkubation mit dem FT die IL-6-Ausschüttung bei keinem der Fragmente in statistisch signifikantem Ausmaß gesenkt werden, bei manchen Fragmenten stieg die IL-6-Konzentration in diesem Fall sogar an (Abb. 4.29).

Zusammenfassung:

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die nAK α -Syn die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6 spezifisch und in signifikantem Ausmaß reduzieren können, mit Ausnahme des Fragments 61-140 für TNF α .

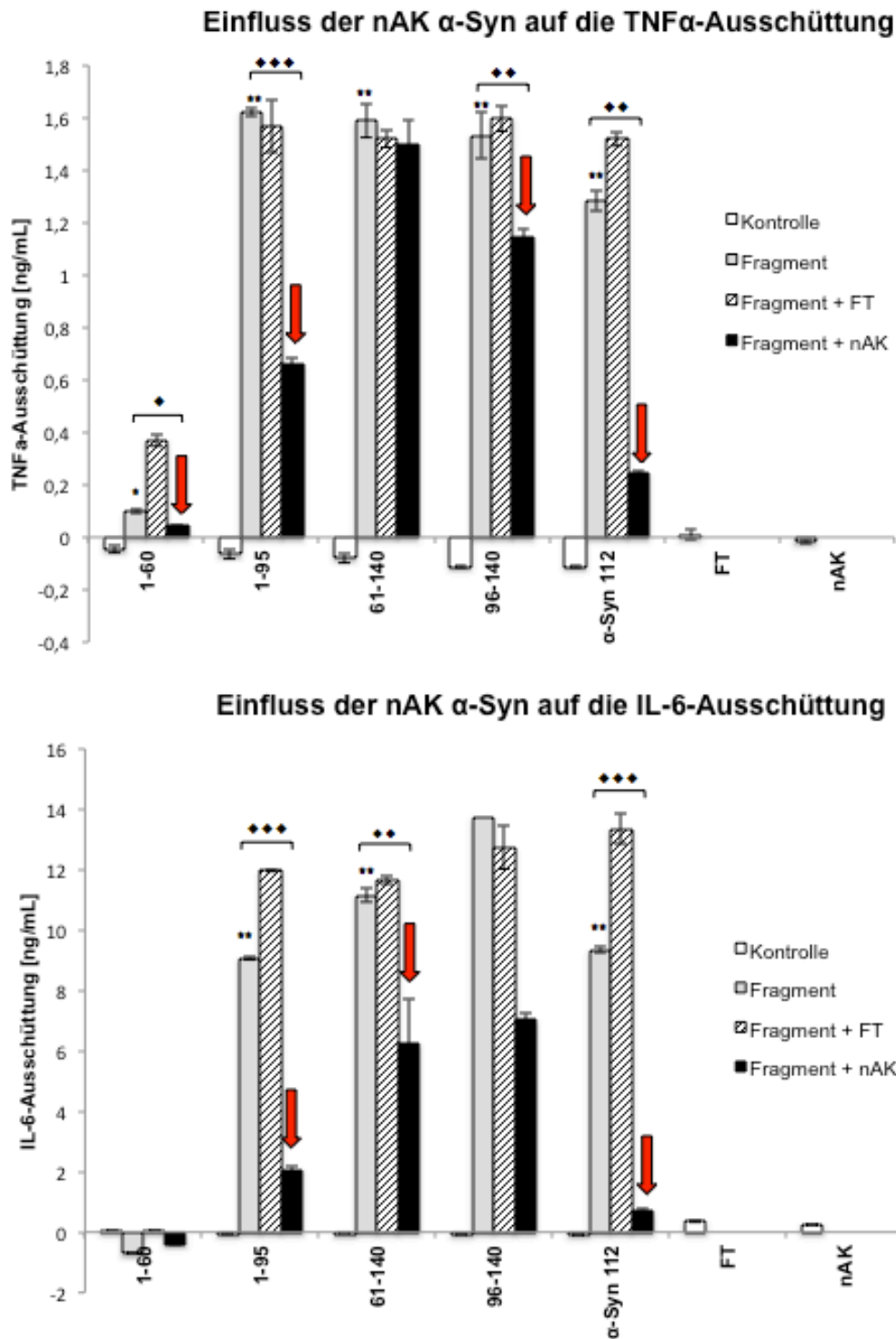


Abb. 4.27 Einfluss der nAK α -Syn auf die Fragment-induzierte Zytokin-Ausschüttung

200 nM der nAK α -Syn wurden für 1h mit 1 μ M der Fragmente vorinkubiert, anschließend wurde beides auf primäre Mikroglia gegeben und für 24h inkubiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen gewählt. Die Ausschüttung von TNF α bzw. IL-6 im Kulturmedium wurde anhand der Absorption im ELISA quantifiziert. Die Ergebnisse sind angegeben als anhand einer Standardkurve berechnete Konzentration in ng/mL und dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (STABW). Sie stammen aus zwei unabhängig voneinander wiederholten Experimenten mit Zweifachbestimmung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *t*-Test, signifikante Unterschiede sind für den Vergleich zur Kontrolle dargestellt als * ($p < 0,01$) und ** ($p < 0,001$), für den Vergleich zum Fragment als ♦ ($p < 0,05$), ♦♦ ($p < 0,01$) und ♦♦♦ ($p < 0,001$). Die im Vergleich zum Fragment statistisch signifikante Reduktion der Zytokinausschüttung durch die nAK α -Syn wurde mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

4.6 Zusammenfassung Ergebnisse

Die in den aufgeführten Experimenten gefundenen Eigenschaften der getesteten α -Synuclein-Fragmente sind in Tab. 4.5 zusammengefasst.

Tab. 4.5 Eigenschaften der α -Synuclein-Fragmente von r-Peptide
Molekulargewicht und Daten aus den durchgeführten Experimenten

| Frag- ment | Molekular- gewicht | Eigenschaften in den vorgenommenen Experimenten |
|--|-------------------------------|---|
| 1-60 | 6,149 kDa | <ul style="list-style-type: none"> • Induziert in höherer Konzentration Zytokinausschüttung. |
| 1-95 | 9,391 kDa | <ul style="list-style-type: none"> • Zellschädigend auf primären Neuronen (frisch + gealtert). • Induziert Zytokinausschüttung. |
| 61-140 | 8,460 kDa | <ul style="list-style-type: none"> • Höchste Bindungsaffinität im Dot Blot an nAK α-Syn. • Am ausgeprägtesten zellschädigend auf primären Neuronen und Mikroglia (frisch + gealtert). • Induziert Zytokinausschüttung. • Liegt als einziges Fragment gealtert in β-sheet-Form vor. |
| 96-140 | 5,217 kDa | <ul style="list-style-type: none"> • Höchste Bindungsaffinität an nAK α-Syn im ELISA. • Induziert Zytokinausschüttung. |
| α-Syn 112 | 11,371 kDa | <ul style="list-style-type: none"> • Gealtert zellschädigend auf primären Neuronen. • Induziert Zytokinausschüttung. |

5. Diskussion

Die genaue Ätiologie des IPS ist bislang nur unzureichend verstanden. Angenommen wird ein Zusammenwirken von genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren sowie durch den natürlichen Alterungsprozess entstehender Veränderungen. Dadurch kommt es zum Untergang von dopaminergen Neuronen in der SNpc, zum Auftreten von pathologischen α -Synuclein-Aggregaten und zur Neuroinflammation. Es gibt dabei zunehmende Evidenz dafür, dass die durch Mikroglia ausgelöste Inflammation nicht nur Folge der neuronalen Degeneration darstellt, sondern auch den dopaminergen (DA) Zelluntergang in dieser Struktur über Monate und Jahre aufrechterhält.

Bislang sind für das IPS lediglich symptomatische Therapiemöglichkeiten verfügbar. Da es mit dem derzeitigen Wissensstand noch nicht möglich ist, die Krankheitsentstehung zu verhindern oder das IPS kurativ zu behandeln, ist die Entwicklung neuroprotektiver oder krankheitsmodifizierender Therapiestrategien ein richtungsweisender Ansatz. Dazu zählen unter anderem die Verhinderung der Entstehung toxischer α -Synuclein-Aggregationsformen bzw. Entfernung oder Neutralisierung dieser Aggregate, bevor sie ihre schädigende Wirkung entfalten können. Außerdem gilt es, die Entwicklung einer schädlichen Neuroinflammationskaskade zu verhindern.

Die physiologische Rolle der nAK α -Syn im menschlichen Organismus ist bislang kaum bekannt. Bislang vorliegende Daten weisen auf neuroprotektive Effekte der nAK α -Syn hin, deshalb soll deren möglicher therapeutischer Einsatz untersucht werden. Dazu sind jedoch noch weitere Erkenntnisse über die natürliche Funktion der Autoantikörper notwendig. Daher bietet die genauere Kenntnis der nAK α -Syn- α -Synuclein-Interaktion eine wichtige Grundlage für deren besseres Verständnis. Durch die Verwendung von einzelnen funktionellen α -Synuclein-Domänen und einer natürlich vorkommenden Deletionsmutante des Proteins lässt sich die Interaktion mit den Autoantikörpern differenzierter als nur mit dem Gesamtprotein beurteilen.

Im Weiteren soll die Umsetzbarkeit der Erkenntnisse dieser Arbeit hinsichtlich physiologischer Funktion der Autoantikörper und deren therapeutischen Potenzial diskutiert werden.

5.1 Probleme bei der Etablierung des Epitope Mappings

Es war nicht möglich, α -Synuclein mit ausreichender Effizienz an monoklonale oder natürliche α -Synuclein-Autoantikörper, die an eine CarboLink™- bzw. Sepharose-Säule gekoppelt waren, zu binden. Dies wäre für das geplante Epitope Mapping aber erforderlich gewesen. In allen durchgeführten Bindungstests (ELISA, Immunpräzipitation, Dot Blot) zeigte sich allerdings eine gute Bindung von α -Synuclein an sowohl mAK α -Syn als auch nAK α -Syn. Deswegen ist anzunehmen, dass α -Synuclein unter den verwendeten Bindungsbedingungen in seiner Bindungsfähigkeit eingeschränkt wird, in dem es beispielsweise eine Konformation einnimmt, in der das Epitop den mAK/nAK α -Syn nicht zugänglich ist. Dies könnte durch die hier verwendeten speziellen Puffer bedingt sein, da bei der ähnlich aufgebauten Immunpräzipitation die Bindung von α -Synuclein an das Trägermaterial Protein G gekoppelte α -Synuclein-Antikörper möglich war (123). Dabei werden jedoch andere Puffer eingesetzt. Mit unseren Methoden ließ sich nicht genauer feststellen, woran die mangelnde Bindung unter den Bedingungen der CarboLink™- bzw. Sepharose-Säule lag.

5.2 α -Synuclein-Fragmente: Aggregation und Toxizität

Auf primären kortikalen Neuronen erwiesen sich die α -Syn-Fragmente 1-95 und 61-140 bereits frisch angesetzt als zellvitalitäts-reduzierend, das α -Syn-Fragment α -Syn 112 aber nur gealtert. Im Gegensatz dazu beeinflusste α -Synuclein weder frisch noch gealtert die Zellvitalität. Allen zellschädigenden α -Syn-Fragmenten ist gemeinsam, dass sie die NAC-Region (AS 61-95) beinhalten, deren erhöhte Aggregationstendenz und damit verbundene Toxizität bereits an der kultivierten dopaminergen Zelllinie *SHSY-5Y* in der Literatur beschrieben wurde (9, 10, 41, 58). Zudem wurden N- sowie C-terminale Trunkierung mit erhöhter Aggregationsneigung von α -Synuclein in Verbindung gebracht (63, 74, 107). α -Syn 112, eine durch alternatives Spleißen entstehende C-terminale α -Synuclein-Deletionsmutante, und C-terminal trunkiertes α -Synuclein wurden auch unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen (5, 74). Um deren mögliche Beteiligung an pathologischen Veränderungen genauer zu beleuchten, ist die Kenntnis des Aggregations- und Toxizitätsverhaltens dieser natürlich entstehenden α -Syn-Fragmente von besonderer Bedeutung. Die nicht

zellschädigenden α -Syn-Fragmente 1-60 bzw. 96-140 repräsentieren nur die C- bzw. N-terminale Domäne und beinhalten nicht die zentrale NAC-Region.

Dies führt zu der Annahme, dass 1) die NAC-Region wichtig für die Vitalitätsreduktion der α -Syn-Fragmente auf primären kortikalen Neuronen ist und 2) die α -Syn-Fragmente im Gegensatz zu α -Synuclein zusätzliche Eigenschaften aufweisen, wie beispielsweise eine durch Trunkierung erhöhte Aggregationstendenz, die zu ihrer zellschädigenden Wirkung führen könnte.

Auf primären Mikroglia führten die gleichen α -Syn-Fragmente wie auf primären Neuronen zu einer Vitalitätsreduktion, was für den oben beschriebenen Einfluss von NAC-Region sowie N- und C-terminaler Trunkierung spricht.

In der CD-spektrometrischen Untersuchung der Sekundärstruktur fand sich lediglich für das α -Syn-Fragment 61-140 ein Übergang von der physiologischen random coil-Struktur des frisch angesetzten 61-140 zur pathologischen β -sheet-Struktur des gealterten α -Syn-Fragments. Auch erwies sich gealtertes 61-140 als deutlich toxischer als frisch gelöstes. Für toxische(s) α -Syn(-Fragmente) wurde bereits mehrfach das Vorliegen einer zur Aggregation prädisponierenden β -sheet-Struktur beschrieben (10, 41, 57, 131). Jedoch ist eine Vitalitätsreduktion auf primären Neuronen auch ohne nachweisbare Ausbildung einer β -sheet-Struktur möglich, wie im Falle von α -Syn-Fragment 1-95 und α -Syn 112. In der CD-Spektroskopie können nur Veränderungen von Amidbindungen detektiert werden, wodurch Dimer- und Trimerisierung, die ohne diese Veränderung ablaufen, nicht erkannt werden können. *Mihajlovic et al.* zeigten an α -Syn 1-95 die Ausbildung von energetisch stabilen Dimeren, worauf sie spekulierten, dass die Dimerisierung ein früher Aggregationsschritt sein könnte, der noch vor der Ausbildung einer β -sheet-Form abläuft (81). So könnte es sein, dass 61-140 lediglich schneller als die anderen beiden α -Syn-Fragmente die β -sheet-Form ausbildet. Dagegen beschrieben *Serpell et al.* für C-terminal trunkiertes α -Synuclein bereits die Ausbildung der β -sheet-Form nach 1-2 Tagen Inkubation unter Schütteln (107). In den hier durchgeführten Versuchen erfolgten die Messungen nur an den frisch angesetzten sowie 7 Tage gealterten α -Syn-Fragmenten. Diese veränderten Voraussetzungen könnten die unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

5.3 Bedeutung natürlich vorkommender α -Syn-Autoantikörper

Nachdem lange Zeit angenommen wurde, dass Autoantikörper ausschließlich pathologische Eigenschaften besitzen, konnte in den letzten Jahren vermehrt das Vorkommen natürlicher Autoantikörper (nAK) im Serum von Gesunden nachgewiesen werden. Diese besitzen meist eine niedrige bis mittlere Affinität, sind polyreaktiv und werden unabhängig von exogenen Stimuli generiert. nAKs scheinen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität und Regulierung der Zellhomöostase zu spielen. So erkennen sie veränderte Proteine und nekrotische Zellen und können deren Phagozytose anregen. Zudem interagieren sie mit dendritischen Zellen sowie B- und T-Zellen (23, 25, 75, 109).

In der Arbeitsgruppe für *Neurologische Therapieforschung* der Neurologischen Klinik wurden analog zur nAK α -Syn-Aufreinigung bereits ähnliche natürliche Autoantikörper gegen Amyloid β (A β) isoliert, welches bei der Alzheimer'schen Erkrankung (AD) eine wichtige Rolle spielt. Diese Autoantikörper konnten zum einen die A β Toxizität hemmen und zum anderen Oligomerisierung und Plaque-Ausbildung verhindern (35, 37). Zudem wurde gezeigt, dass die nAK α -Syn die Fibrillierung von α -Synuclein hemmen sowie der durch fibrilliertes α -Synuclein induzierten Beeinträchtigung der Zellvitalität auf SHSY-Zellen entgegen wirken können (4). Dies weist, ähnlich den nAK A β , auf die protektive Funktion der nAK α -Syn hin.

Natürlich vorkommende Autoantikörper gegen α -Synuclein wurden erstmals von *Papachroni et al.* aus dem Serum von Gesunden sowie an IPS und familiären Parkinsonismus-Syndromen leidenden Patienten isoliert (92). Darüber hinaus zeigten *Yanamandra et al.* kürzlich, dass beim IPS das Gleichgewicht natürlich vorkommender α -Synuclein-Autoantikörper erheblich gestört ist. Sie fanden bei IPS Patienten im Frühstadium stark erhöhte Autoantikörpertiter gegen monomeres α -Synuclein. Dagegen waren die Autoantikörpertiter bei gesunden Kontrollen und IPS Patienten im Spätstadium deutlich niedriger. Außerdem war die Immunantwort gegen fibrilläres α -Synuclein in der Kontrollgruppe am Höchsten und mit zunehmendem Krankheitsverlauf immer weiter reduziert. Die temporäre Erhöhung der gegen monomeres α -Synuclein gerichteten Autoantikörper könnte auf deren protektive Funktion hindeuten (136).

Zur Affinitätsaufreinigung der nAK α -Syn wurde monomeres α -Synuclein verwendet. Da α -Syn jedoch durch verschiedenste Einflussfaktoren leicht zur Aggregation gebracht werden kann, ist es möglich, dass sich im Laufe der erforderlichen Inkubation auch α -Syn-Dimere, -Trimere oder -Oligomere bilden (3, 123). Diese könnten dann gleichzeitig mit den α -Syn-Monomeren auf der Affinitätssäule vorliegen. Dadurch könnten verschiedenartige natürliche Autoantikörper aus der IVIG-Mischung an die Affinitätssäule binden, die jeweils bestimmte einzelne α -Syn-Formen erkennen. Letztendlich könnten die nAK α -Syn eine Mischung dieser unterschiedlichen Autoantikörper darstellen. Mit den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden war es allerdings nicht möglich, die auf der Affinitätssäule vorliegende(n) α -Synuclein-Form(en) genauer zu bestimmen.

Als Epitop bezeichnet man diejenige Aminosäuresequenz, an die die Fc-Bindungsregion eines Antikörpers bindet. Man unterscheidet zwischen linearen Epitopen, bei denen diese Sequenz aus in der Primärstruktur nebeneinanderliegenden Aminosäuren besteht, und konformationalen Epitopen. Bei letzteren sind die die Epitopsequenz bildenden Aminosäuren nicht in der Primärstruktur linear angeordnet, sondern kommen erst durch Faltung in der Sekundär- oder Tertiärstruktur nebeneinander zu liegen (76).

In einem von Daniela Besong-Agbo durchgeführtem Peptide Array zum Epitope Mapping fanden sich die Epitope für die nAK α -Syn auf den Aminosäuren 74–79 in der NAC-Region sowie den N-terminalen Aminosäuren 1-10 und 31-34 (4). Dagegen wurden in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Dot Blot Bindungsassays nur α -Syn-Fragmente gebunden, die die NAC-Region enthielten. Damit beinhalten sie gleichzeitig auch das im Peptide Array gefundene Epitop auf den Aminosäuren 74-79. Jedoch zeigte sich keine Bindung des N-terminalen α -Syn-Fragments 1-60, das laut den Peptide Array Ergebnissen auch Epitope beinhalten sollte. Im ELISA wurde wiederum das C-terminale α -Syn-Fragment 96-140 besonders affin gebunden, welches im Peptide Array gar kein Epitop aufwies. Es ist daher anzunehmen, dass zusätzlich zu den im Peptide Array gefundenen linearen Epitopen noch konformationale Epitope bestehen. Letztere können nicht mittels Peptide Array nachgewiesen werden, dafür aber in Dot Blot oder ELISA-Bindungsassays. Diese Annahme wäre auch vereinbar mit dem unterschiedlichen Bindungsverhalten der Fragmente in Dot

Blot und ELISA, da aufgrund der beschriebenen differierenden Bindungsbedingungen konformationale Epitope unterschiedlich gut erkannt werden könnten. So werden die auf der ELISA-Platte aufgetragenen α -Syn-Fragmente partiell adsorbiert, wodurch im Gegensatz zum Dot Blot möglicherweise nicht die gesamte α -Synuclein-Struktur zugänglich ist (86). Zur weiteren Aufklärung und der Überprüfung der im Dot Blot bzw. ELISA generierten Daten wären Untersuchungen mittels Surface Plasmon Resonance (SPR) sinnvoll (82); mittels diesem Verfahren können Interaktionen von Biomolekülen näher identifiziert und charakterisiert werden. Diese Versuche werden gerade in unserem Labor durchgeführt und erste Ergebnisse zeigen, dass die SPR validere Daten generieren kann, die die Interaktion von α -Syn und nAK α -Syn genau zu charakterisieren in der Lage sind (persönliche Mitteilung).

5.4 Inhibition der Toxizität auf primären Neuronen

Es zeigte sich unerwarteterweise, dass sowohl der FlowThrough (FT) als auch nAK α -Syn gleichermaßen die zellschädigende Wirkung der α -Syn-Fragmente 1-95 und α -Syn 112 aufheben konnten. Dieser Effekt traf jedoch nicht für das α -Syn-Fragment 61-140 zu. Dies lässt spekulieren, dass durch die Vorinkubation mit IgG-Antikörpern ein unspezifischer Schutzmechanismus gegeben wird. Die nAK α -Syn werden aus intravenösen Immunglobulinen (IVIG) über eine Affinitätssäule aufgereinigt. Alle Antikörper, die nicht spezifisch an die Affinitätssäule binden, werden als FlowThrough aufgesammelt. Dieser enthält also, bis auf die auf der Säule verbliebenen nAK α -Syn, alle Antikörper aus der IVIG-Zubereitung. Der Antikörpermischung in IVIG werden vielfältige immunmodulierende Effekte zugeschrieben (53, 116). *Magga et al.* beschrieben einen protektiven Effekt für IVIG gegen die Toxizität von A β auf primären murinen neuronalen Zellen. Dabei band IVIG an A β -Aggregate und förderte deren Mikroglia-vermittelten Abbau (77). Dagegen waren die gefundenen neuroprotektiven Effekte der nAK A β spezifisch und konnten nicht durch die IVIG-Antikörper im FlowThrough erzielt werden (38). Der in den vorliegenden Experimenten beobachtete neuroprotektive Effekt des FT könnte zum Beispiel durch Bereitstellung von toxizitäts-neutralisierenden Antikörpern vermittelt sein (53, 116). Möglich wäre auch, wie in der von *Magga et al.* beschriebene A β -Studie, eine durch Mikroglia/Astrozyten-vermittelte Entfernung der α -Syn-Fragmente. Beide Zell-

arten waren zu einem Anteil von etwa 10% in der neuronalen kortikalen Mischkultur enthalten. Die weitere Frage ist, warum sich der beschriebene protektive Effekt nur für zwei der drei toxischen α -Syn-Fragmente zeigt. Im Gegensatz zu 61-140 beinhalten sowohl 1-95 sowie α -Syn 112 beide die N-terminale Domäne. Wie die Ergebnisse des Peptide Arrays von Daniela Besong Agbo zeigten (4), befinden sich in der N-terminalen Domäne zwei lineare Epitope für die nAK α -Syn. Diese Domäne könnte auch für die Interaktion mit den anderen AKs des FTs wichtig sein. Zum anderen liegen die beiden α -Syn-Fragmente anders als 61-140 in der random-coil-Struktur vor. In dieser Struktur bieten sich möglicherweise andere Epitope dar als bei dem in β -sheet-Struktur vorliegendem 61-140. Die genauen Auswirkungen von IVIG auf α -Synuclein und seine Unterformen, z.B. auch Oligomere, sind im Gegensatz zu A β noch nicht von anderen Gruppen beschrieben wurden und bleiben daher Gegenstand weiterer Forschung.

5.5 Neuroinflammation

Im Rahmen von Inflammationsvorgängen im ZNS kommt es zur Aktivierung von Mikroglia und damit verbunden zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Die genaue Rolle der Neuroinflammation im IPS ist noch nicht genau geklärt. Es ist fraglich, ob die Inflammation bereits früh im Krankheitsgeschehen entsteht und dann kausal zur Neurodegeneration führt, oder ob sie erst im späteren Krankheitsverlauf reaktiv durch den Zelluntergang induziert wird. Auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise beim Morbus Alzheimer und der Amyotrophen Lateralsklerose, sind Inflammationsprozesse an neurodestruktiven Vorgängen beteiligt (8, 45).

In einer epidemiologischen Meta-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von Ibuprofen mit einem verminderten IPS Risiko verbunden war. Dies deutet auf einen möglichen protektiven Effekt anti-inflammatorischer Therapie im IPS hin (48).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob α -Syn-Fragmente die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6 auf primären mesencephalen murinen Mikroglia induzieren und diese somit aktivieren können. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle α -Syn-Fragmente sowie das Gesamtprotein die Ausschüttung dieser beiden proinflammatorischen Zytokine hervorrufen konnten.

Mikroglia sind als immunkompetente Zellen des ZNS wichtig für die Phagozytose und Antigenpräsentation, sie sezernieren zudem immunmodulatorische Stoffe. Der höchste Gehalt an Mikroglia befindet sich in der Substantia Nigra. Sie liegen normalerweise in ruhendem Zustand vor und werden durch Verletzungen und pathogene Substanzen aktiviert. Unter bestimmten Umständen können sie überaktiviert werden und sezernieren dann überschießend proinflammatorische Zytokine und Sauerstoffradikale. Beide können zum Untergang von Neuronen beitragen, wodurch wiederum konsekutiv Mikroglia aktiviert werden. Dieser Teufelskreis wird als "reaktive Mikrogliose" bezeichnet (8, 45, 51, 54, 117).

Vor etwa 20 Jahren wurden erstmals vermehrt aktivierte Mikroglia in der Substantia Nigra sowie erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, 2 und 6 im Striatum bei IPS Patienten beschrieben (80, 83).

2005 konnte von *Zhang et al.* gezeigt werden, dass extrazellulär hinzugegebenes α -Synuclein, vor allem in aggregierter Form, einen Aktivierungsreiz für Mikroglia in der primären Kultur darstellte. α -Synuclein wirkte auch toxisch auf dopaminerge Neurone, durch Zugabe von Mikroglia zur neuronalen Kultur wurde die toxische Wirkung von α -Synuclein noch zusätzlich verstärkt, was auf die Bedeutung von aktivierten Mikroglia am neuronalen Untergang hinweist (29, 138).

Su et al. fanden, dass eine Überexpression von α -Synuclein im transgenen Mausmodell zur erhöhten Mikrogliaaktivierung und $\text{TNF}\alpha$ -Expression führte. Die Aktivierung von Mikroglia mit α -Synuclein ging dem dopaminergen neuronalen Untergang lange voraus, worauf sie spekulierten, dass die α -Synuclein-getriggerte Mikrogliaaktivierung im frühen Krankheitsgeschehen auftritt und zeitverzögert zum späteren neuronalen Untergang führt. Zusätzlich zeigten sie in einer primären Mikrogliakultur, dass extrazellulär zugegebenes wild-type α -Synuclein sowie mutiertes α -Synuclein direkt Mikroglia aktivierten und damit verbunden zur Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und $\text{IL-1}\beta$, sowie der proinflammatorischen Botenstoffe iNOs und COX-2, führten. Dabei wurde die $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung am stärksten aktiviert. Somit führte α -Synuclein nicht nur zum direkten neuronalen Untergang, sondern auch indirekt über Mikrogliaaktivierung und damit verbundener Freisetzung proinflammatorischer Substanzen (118, 119).

Weitere Hinweise auf die Bedeutung von α -Synuclein in der Aktivierung von Mikroglia und dem Untergang dopaminerg Neurone in der SNpc sind:

- 1.) α -Synuclein Knockout-Mäuse zeigten sich resistenter gegenüber der mit MPTP-induzierten Toxizität auf dopaminerge Neurone in der SNpc (32).
- 2.) Durch Behandlung mit anti-inflammatorischen Substanzen konnte dagegen die nigrale dopaminerge Neurodegeneration im Tiermodell reduziert werden. Beispielsweise half die Blockade von Mikrogliaaktivität mit dem Stoff Minocyclin gegen die durch MPTP hervorgerufene Neurodegeneration (134). Die SNpc enthält einen besonders hohen Anteil an Mikroglia, dadurch könnte diese Region besonders anfällig gegenüber Inflammation und oxidativem Stress sein (69).

Gao *et al.* zeigten, dass durch chronische Inflammation, die zur Aktivierung von Mikroglia und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Radikale führte, zeitlich verzögert spezifisch dopaminerge SNpc Neurone degenerierten. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die ursächliche Beteiligung von aktivierten Mikroglia am Absterben nigraler dopaminerg Neurone (47).

Zusammenfassend lässt sich aus den dargestellten Arbeiten folgern, dass durch α -Synuclein Mikroglia aktiviert werden können, die dann proinflammatorische Stoffe freisetzen. Falls dieser Inflammationszustand nicht limitiert werden kann, führen die chronischen Inflammationsbedingungen letztendlich zum Untergang dopaminerg Neuronen in der SNpc.

Übereinstimmend mit den aufgeführten Ergebnissen anderer Gruppen konnte in der vorliegenden Arbeit über den Nachweis der Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF α - und IL-6 gezeigt werden, dass die α -Synuclein-Fragmente primäre mesencephale Mikroglia aktivierten.

Der Mechanismus, über den α -Synuclein Mikroglia aktiviert, ist noch nicht genau bekannt, angenommen wird eine Beteiligung des Klasse B Scavenger Rezeptors CD36, der auch von A β -Fibrillen aktiviert wird. Dieser Rezeptor erkennt eine Vielzahl pathogener Substanzen und führt dann über die Aktivierung intrazellulärer Signalwege zu Phagozytose und Inflammation (118, 119).

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von extrazellulär zugegebenem α -Synuclein zu primären Mikroglia und Neuronen getestet. α -Synuclein liegt auch unter physiologischen Bedingungen zu einem geringen Anteil extrazellulär vor, es wird dabei von den Zellen sezerniert (42, 71). Wie oben beschrieben, konnte

die Mikrogliaaktivierung in der Literatur sowohl durch extrazellulär hinzugefügtes α -Synuclein, als auch durch α -Synuclein-Überexpression, erreicht werden (118, 119, 138). Es bleibt jedoch offen, ob diese beiden Mechanismen zu einer vergleichbaren Aktivierung von Mikroglia führen und welche Bedeutung extrazellulärem α -Synuclein in der Pathogenese des IPS zukommt (101).

Am ausgeprägtesten waren sowohl die $\text{TNF}\alpha$ - als auch die IL-6-Ausschüttung für die zentrale NAC-Region und/oder die C-terminale Domäne enthaltende α -Syn-Fragmente. Die N-terminale Domäne führte nur zu einer geringen, wenn auch statistisch signifikanten, Zytokinausschüttung. Somit scheinen vor allem NAC-Region und C-terminale Domäne die Aktivierung von Mikroglia zu induzieren.

Lee et al. testeten die Auswirkung von frischen α -Syn-Fragmenten auf Mikroglia (RAW 264.7-Zellen), sie verwendeten dabei ebenfalls das N-terminale α -Syn-Fragment 1-60, das C-terminale α -Syn-Fragment 96-140 sowie das aus NAC-Region + C-Terminus bestehende α -Syn-Fragment 61-140. Zusätzlich testeten sie auch das α -Syn-Fragment ΔNAC , bei welchem die zentrale NAC-Region fehlt. Sie fanden dabei heraus, dass mit den α -Syn-Fragmenten 61-140 und ΔNAC behandelte Zellen dosisabhängig $\text{TNF}\alpha$ sezernierten, während die rein N- oder C-terminalen α -Syn-Fragmente zu keiner signifikanten $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung führten. Daraus schlussfolgerten sie, dass für die Aktivierung von Mikroglia das gleichzeitige Vorhandensein von N- und C-Terminus notwendig sei, nicht jedoch die NAC-Region (73). Dies entspricht nicht vollständig den hier gefundenen Ergebnissen, bei denen 61-140 gleichermaßen wie reine C-terminale α -Syn-Fragmente die Zytokinausschüttung induzierten und die N-terminalen Fragmente auch in geringerem, jedoch statistisch signifikantem Ausmaß, die Zytokinausschüttung anregten. Allerdings verwendeten *Lee et al.* nur frisch angesetzte α -Syn-Fragmente und maßen lediglich die $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung. In den hier beschriebenen Ergebnissen zur $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung frisch angesetzter α -Syn-Fragmente wurde durch das N-terminale α -Syn-Fragment keine $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung induziert und durch das C-terminale α -Syn-Fragment nur eine geringe, wenn auch statistisch signifikante, Ausschüttung erzielt. Erst die gealterten C- und N-terminalen α -Syn-Fragmente führten zu einer stärkeren $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung. Dagegen wurde die IL-6-Ausschüttung

kaum vom Alterungszustand der α -Syn-Fragmente beeinflusst. Somit sind die Ergebnisse von *Lee et. al* hinsichtlich der $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung frisch angesetzter α -Syn-Fragmente zu den hier gefundenen vergleichbar. Zusätzlich konnte hier gezeigt werden, dass durch den Alterungsprozess der α -Syn-Fragmente die $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung auch durch N- und C-terminale α -Syn-Fragmente einzeln ausgelöst werden konnte.

Klegeris et al. zeigten, dass eine α -Synuclein-Variante mit einer Deletion der Aminosäuren 71-82 in der NAC-Region gleichwertig dem Wildtyp-Protein die $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung anregen konnte. Da die NAC-Region, wie bereits erwähnt, essentiell für die Aggregation von α -Synuclein ist, weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass α -Synuclein-Aggregation keine Voraussetzung für die proinflammatorische Wirkung von α -Synuclein ist (66).

Die beschriebenen Versuche wurden an primären Mikroglia durchgeführt. Dies ist das übliche *in vitro* Modell zur Untersuchung der Zytokinausschüttung. Da sich diese primären Zellen *ex vivo* nicht im Ruhezustand befinden, kann dies jedoch dazu führen, dass die Mikroglia bereits im Grundzustand unphysiologisch stark aktiviert sind. Auch können in der reinen Mikrogliaultur die Einflüsse anderer Zellen nicht erfasst werden, da Homöostasemechanismen fehlen. Bezüglich der Zytokinausschüttung in der Zellkultur ist darüberhinaus zu beachten, dass die Zellen durch die Präparation bereits gestresst werden können (51). In den vorliegenden Ergebnissen zeigte sich jedoch keine Zytokinausschüttung für die lediglich mit Lösungsmittel behandelten Mikroglia, die als Kontrollen dienten.

Nach Vorinkubation mit den nAK α -Syn konnte bei allen α -Syn-Fragmenten, mit Ausnahme von α -Syn-Fragment 61-140, die $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung signifikant reduziert werden.

$\text{TNF}\alpha$ ist ein an akuten und chronischen Entzündungsvorgängen beteiligtes Zytokin. Im ZNS wird es von Mikroglia, Astroglia und Lymphozyten ausgeschüttet. Seine Synthese wird durch Verletzungen, bakterielle und virale Stimuli und immunologische Reize wie Zytokine, Immunkomplexe und Komplementfaktoren angeregt und kann transkriptional, post-transkriptional sowie translational beeinflusst werden. Ihm werden sowohl neuroprotektive als auch -destruktive

Funktionen zugeschrieben. Es soll es an Neurogenese und synaptischer Funktion beteiligt sein (20, 51, 84). Normalerweise wird die Ausschüttung von $\text{TNF}\alpha$ selbstregulatorisch limitiert. Bei IPS Patienten werden sowohl im Striatum als auch im Liquor cerebrospinalis im Vergleich zu Gesunden erhöhte $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gefunden, was auf eine Beteiligung von $\text{TNF}\alpha$ am Untergang der dopaminergen SNpc Neuronen hinweist (2, 11).

Des Weiteren wurde beschrieben, dass $\text{TNF}\alpha$ Polymorphismen mit einem erhöhten Risiko für das IPS sowie familiäre Parkinsonismus-Syndrome einhergehen (7, 129).

Die Ablation von $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren im Mausmodell verhinderte die Toxizität von appliziertem MPTP auf dopaminerge Neurone (115). Dagegen hatte akute Administration von $\text{TNF}\alpha$ in einer Studie keinen negativen Einfluss auf das Überleben von SNpc Neuronen (21).

Generell ist jedoch die Datenlage über den Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ auf die Pathogenese des IPS stark widersprüchlich. Während einerseits protektive Effekte beschrieben wurden, gibt es auch viele Hinweise für einen negativen neurodestruktiven Einfluss (84, 93).

Kürzlich zeigten *Chertoff et al.* in einem Mausmodell mit intrastriataler 6-Hydroxydopaminapplikation den Effekt von $\text{TNF}\alpha$ auf die nigrostriatale Neurodegeneration. Dieses Modell wird im Gegensatz zum MPTP-Mausmodell v.a. zur Erzeugung chronischer Degenerationsprozesse in der Substantia nigra verwendet. Dauerhafte niedrige Expression des $\text{TNF}\alpha$ -Levels reduzierte die durch Hydroxydopamin verursachte Neurodegeneration. Dagegen wurde durch chronische hohe Expression des $\text{TNF}\alpha$ -levels die Neurodegeneration noch zusätzlich verstärkt. Dies zeigt, dass $\text{TNF}\alpha$ sowohl protektive als auch destruktive Wirkungen haben kann, die von der Höhe der Konzentration sowie der Dauer der Expression abhängig zu sein scheinen (24).

Die IL-6-Ausschüttung konnte bei allen α -Syn-Fragmenten durch die nAK α -Syn signifikant reduziert werden. IL-6 ist ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin. Es wurde jedoch zudem ein neuroprotektiver Effekt beschrieben, da die MPTP Toxizität auf dopaminerge Neuronen bei IL-6-defizienten Mäusen ausgeprägter war als bei IL-6 intakten Tieren (12). Gleichzeitig ist jedoch die Beteiligung von IL-6 an inflammatorischen ZNS-Prozessen gut belegt (64, 126).

Durch Vorinkubation mit dem FlowThrough konnte die $\text{TNF}\alpha/\text{IL-6}$ -Ausschüttung bei keinem der α -Syn-Fragmente in statistisch signifikantem Ausmaß gesenkt werden, bei manchen α -Syn-Fragmenten stieg die Zytokinkonzentration in diesem Fall sogar an.

Dies führt zu der Annahme, dass die nAK α -Syn spezifisch die $\text{TNF}\alpha/\text{IL-6}$ -Ausschüttung der α -Syn-Fragmente inhibieren können, und zwar weitgehend unabhängig vom α -Syn-Fragment. Dies könnte über folgende Mechanismen vermittelt sein (nach (88)):

- 1) Neutralisierung der α -Syn-Fragment-Toxizität durch die Autoantikörper
- 2) Antikörper-vermittelte Phagozytose der α -Syn-Fragmente durch Mikroglia
- 3) Gleichgewichtsverschiebung von α -Synuclein/Autoantikörperkomplexen von zentralen zu peripheren Kompartimenten

Die nAK α -Syn konnten bei beiden Zytokinen die Zytokinausschüttung bei den α -Syn-Fragmenten 1-95 und α -Syn 112 am stärksten reduzieren. Bei den Versuchen an primären Neuronen konnten die Autoantikörper nur die zellschädigende Wirkung dieser beiden α -Syn-Fragmente aufheben. Dies deutet darauf hin, dass die nAK α -Syn zwar mit allen funktionellen Domänen des α -Synucleins interagieren können, jedoch besonders gut mit den α -Syn-Fragmenten mit erhaltener N-terminaler Domäne + NAC-Region. Es bleibt fraglich, warum die unspezifischen Antikörper im FlowThrough einen den nAK α -Syn gleichwertigen protektiven Effekt auf die α -Synuclein-vermittelte Toxizität auf primären Neuronen hatten, jedoch nicht auf primären Mikroglia.

Einen Sonderfall stellt das α -Syn-Fragment 61-140 dar, bei dem die Zytokinausschüttung nur für IL-6 durch die nAK α -Syn reduziert werden konnte, nicht jedoch für $\text{TNF}\alpha$. Wie schon in der Diskussion zu den primären Neuronen angesprochen, liegt 61-140 als einziges gealtertes α -Syn-Fragment in der β -Sheet-Form vor. Dadurch könnten möglicherweise existierende konformationale Epitope für die nAK α -Syn nicht mehr zugänglich sein. Allerdings banden die nAK α -Syn sowohl im Dot Blot als auch im ELISA mit besonders hoher Affinität an das gealterte α -Syn-Fragment 61-140, was gegen ein durch die Änderung der Sekundärstruktur beeinträchtigtes Bindungsverhalten spricht. Möglich wäre auch, dass durch die β -Sheet-Form die Toxizität derart erhöht ist, dass keine

protektive Beeinflussung durch die Bindung der nAK α -Syn an die α -Syn-Fragmente möglich ist (10, 57).

Wie bereits beschrieben, stellt die überschießende Aktivierung von Mikroglia mit darauf folgendem neuronalem Zelltod einen wichtigen Mechanismus in der Pathogenese des IPS dar. Um therapeutisch in diesen Teufelskreis einzugreifen sind zum einen neuroprotektive Maßnahmen möglich. Zum anderen kann auch die Herunterregulierung der Mikrogliaaktivität angestrebt werden, beispielsweise durch Hemmung der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Die hier gezeigte spezifische Inhibierung der durch die α -Syn-Fragmente induzierten TNF α - und IL-6-Ausschüttung durch die nAK α -Syn stellt daher einen vielversprechenden Ansatz dar.

So konnte bereits von *Harms et al.* gezeigt werden, dass durch Inhibierung von TNF α auch tatsächlich eine bestehende progressive Neurodegeneration abgemildert werden konnte. Angewendet wurde eine Dominant-Negativ-TNF α Gentherapie, die zum einen die Mikrogliose in der SNpc reduzieren und auch den progressiven dopaminergen Zelltod stoppen konnte (52).

TNF α -Rezeptor-Inhibitoren werden aktuell erfolgreich in der Behandlung von rheumatischen Erkrankungen eingesetzt. Zudem werden sie nach vielversprechenden experimentellen Ergebnisse in der Alzheimer'schen Erkrankung, die auch mit sekundärer Mikrogliose assoziiert ist, in einer Phase II Studie auf ihr therapeutisches Potenzial an Alzheimer-Patienten getestet (84).

Diese Daten lassen spekulieren, dass ein Erhalt dopaminergener Neuronen durch Modulation der Ausschüttung eines einzigen proinflammatorischen Zytokins möglich sein könnte. Somit bietet sich einen guter Ansatzpunkt für die TNF α - und IL-6-Ausschüttung reduzierenden nAK α -Syn.

5.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die nAK α -Syn ein anti-inflammatorisches Potenzial besitzen. Sie konnten die durch α -Syn-Fragmente induzierte Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF α - und IL-6 auf primären murinen Mikroglia signifikant reduzieren.

Sowohl nAK α -Syn als auch FT konnten die vitalitätsreduzierende Wirkung von zwei α -Syn-Fragmenten auf primären kortikalen Neuronen aufheben, was auf einen direkten neuroprotektiven Effekt hinweist.

Es zeichnete sich ab, dass die nAK α -Syn besonders gut Zellschädigung und inflammatorisches Potenzial der aus N-terminaler Domäne + NAC-Region bestehenden α -Syn-Fragmente 1-95 und α -Syn 112 abschwächen konnten.

Jedoch konnten weder Epitop(e) für die nAK α -Syn noch ein eindeutiges Bindungsmuster der nAK α -Syn an die einzelnen α -Synuclein-Regionen identifiziert werden. Das unterschiedliche Bindungsverhalten in den hier durchgeführten Bindungsassays gibt, im Vergleich zu einem in der Arbeitsgruppe angefertigten Peptide Array, Hinweise auf das wahrscheinliche Vorliegen linearer sowie konformationaler Epitope. Es ist zudem unklar, ob alle nAK α -Syn die gleichen Epitope binden oder ob es unterschiedliche nAK α -Syn gibt. Auch konnte nicht von der Bindungsaffinität der nAKs an ein α -Syn-Fragment auf deren therapeutisches Potential geschlossen werden, da sich insbesondere das durchgehend am affinsten bindende α -Syn-Fragment 61-140 am schlechtesten durch die nAK α -Syn in seiner Toxizität und proinflammatorischer Wirkung beeinflussen ließ.

Neuroinflammation und damit verbundene Überaktivierung von Mikroglia mit resultierender Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des IPS. Daher ist die Regulierung der Mikrogliaaktivität, beispielsweise durch Hemmung der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, ein wichtiger Angriffspunkt für eventuelle Therapeutika.

Zunächst sollte der Einfluss der nAK α -Syn auch unter in vivo-Bedingungen im MPTP- oder 6-Hydroxydopamin-Mausmodell untersucht werden. Es muss getestet werden, ob die nAK α -Syn dort den dopaminergen Zelltod aufhalten, die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine reduzieren sowie die Aggregation von α -Synuclein hemmen können. Des Weiteren wäre der Einfluss des nAK α -Syn auf weitere Zytokine, v.a. auf das ebenfalls proinflammatorische IL-1 β sowie auch auf anti-inflammatorische Neurotransmitter, von Interesse. Zudem

ist für das Verständnis der Funktion der nAK α -Syn weiterhin wichtig, an welche(s) Epitop(e) auf α -Synuclein sie binden und welche Formen von α -Synuclein sie erkennen können.

Langfristig könnten die nAK α -Syn therapeutisch eingesetzt werden. So weist die bisherige Datenlage über ihre unspezifische Steigerung der durch α -Syn-Fragmente reduzierten Zellvitalität primärer Neurone sowie Reduktion der α -Syn-Fragment-induzierten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine auf Mikroglia darauf hin, dass sie protektiv oder krankheitsverzögernd wirken könnten. Dies würde gegenüber den herkömmlichen symptomatisch wirkenden Therapeutika einen großen Fortschritt bedeuten.

Da die Affinitätsaufreinigung der nAK α -Syn aus IVIG eine zeit- und materialaufwendige Methode ist, wäre die Generierung eines monoklonalen nAK α -Syn-Klons eine bedenkenswerte Option. Dafür ist es jedoch genauere Kenntnis über die Epitop/Paratop Interaktion von Nöten. Wünschenswert wäre dafür nach derzeitiger Datenlage ein nAK α -Syn, der bereits die frühen Stufen der Oligomerisierung hemmt, da α -Synuclein-Oligomere als besonders toxisch angesehen werden (28, 31, 128). Zudem sollte er nicht nur den C-Terminus, sondern auch die zu Aggregation und Toxizität neigende NAC-Region erkennen, da physiologisch teilweise C-terminal trunkiertes α -Synuclein sowie C-terminale Deletionsvarianten (α -Syn 112) vorliegen, denen ein schädlicher Einfluss zugesprochen wird (6, 14, 61, 107).

6. Zusammenfassung

Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS) gehört zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen und trotz intensiver Bemühungen stehen bislang noch keine kausalen Therapiemöglichkeiten zur Verfügung.

Lewy-Körperchen, eine der typischen Veränderungen in überlebenden nigralen Neuronen, gelten als pathologische Kennzeichen des IPS. Aggregate von fibrilliertem α -Synuclein (α -Syn), einem aus 140 Aminosäuren (AS) bestehendes Protein, das überwiegend in den präsynaptischen Terminalen von Neuronen im ZNS lokalisiert ist, stellen dabei den Hauptanteil solcher Lewy-Körperchen dar. Kürzlich wurden im Serum von Parkinsonpatienten natürlich vorkommende Autoantikörper gegen humanes α -Syn (nAK α -Syn) nachgewiesen (Papachroni et al., 2007). Solche nAK α -Syn konnten in der Arbeitsgruppe für *Neurologische Therapieforschung* mittels einer Affinitätssäule aus intravenösen Immunglobulinen (IVIG) isoliert und näher charakterisiert werden.

Die physiologische Funktion dieser nAK α -Syn im menschlichen Organismus ist bislang kaum bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, durch genauere Untersuchung der nAK α -Syn- α -Synuclein-Interaktion eine Grundlage für deren besseres Verständnis und mögliche therapeutische Anwendung zu schaffen.

Dafür wurden den einzelnen funktionellen Domänen von α -Syn entsprechende α -Syn-Fragmente verwendet: AS 1-60 (N-terminale Domäne), AS 1-95 (N-terminale Domäne + NAC-Region), AS 61-140 (NAC-Region + C-terminale Domäne), AS 96-140 (C-terminale Domäne) sowie die durch alternatives Spleißen entstehende Deletionsmutante α -Syn 112. Diese α -Syn-Fragmente wurden sowohl frisch als auch 7 Tage gealtert ausgetestet.

Erstens sollte untersucht werden, an welche(s) Epitop(e) der α -Syn-Fragmente die nAK α -Syn binden. Dazu wurde das Bindungsverhalten von nAK α -Syn und α -Syn-Fragmenten in Antigen-Antikörper-Bindungsassays mittels ELISA und Dot Blot analysiert. Jedoch konnten weder Epitop(e) für die nAK α -Syn noch ein eindeutiges Bindungsmuster der nAK α -Syn an die einzelnen α -Synuclein-Regionen identifiziert werden. Das unterschiedliche Bindungsverhalten in den hier durchgeführten Bindungsassays scheint auf das gleichzeitige Vorliegen linearer sowie konformationaler Epitope hinzudeuten.

Zweitens wurde die Wirkung der α -Synuclein-Fragmente auf die Zellintegrität

und mitochondriale Vitalität von primären murinen kortikalen Neuronen und primären murinen Mikroglia in LDH- und MTT-Assay getestet. Bei den α -Syn-Fragmenten 1-95, 61-140 sowie α -Syn 112 konnte eine deutliche proliferations-schädigende Wirkung an neuronalen Zellen im MTT-Assay nachgewiesen werden. Diese zytotoxischen α -Syn-Fragmente wurden dann in einem weiteren Schritt vor Zugabe zu den neuronalen Zellen mit den nAK α -Syn vorinkubiert. Diese hatten auf die α -Syn-Fragmente 1-95 und α -Syn 112 einen neuroprotektiven Einfluss. Dieser Effekt ließ sich allerdings auch durch Vorinkubation der α -Syn-Fragmente mit IVIG beobachten.

Drittens wurde untersucht, ob die extrazellulär zugegebenen α -Syn-Fragmente eine Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine ($\text{TNF}\alpha$ und IL-6) in primären murinen Mikroglia induzieren können. Da dies bei fast allen α -Syn-Fragmenten der Fall war (bis auf 1-60 für IL-6), wurde dann der Einfluss der nAK α -Syn auf die Zytokinausschüttung beurteilt. Durch Vorinkubation mit den nAK α -Syn konnte die α -Syn-Fragment-induzierte $\text{TNF}\alpha$ - und IL-6-Ausschüttung deutlich signifikant reduziert werden (bis auf 61-140 für $\text{TNF}\alpha$). Dies weist erstmalig darauf hin, dass die nAK α -Syn einen entscheidenden anti-inflammatorischen Einfluss auf die durch α -Syn ausgelöste Mikrogliaaktivierung haben. Weiterhin scheinen sie zusammen mit IVIG neuroprotektives Potenzial zu besitzen. Die überschiessende Reaktion der Mikroglia spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese des IPS. Daher kann eine modulatorische Beeinflussung der Mikrogliaaktivität, beispielsweise durch Hemmung der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, einen wichtigen therapeutischen Ansatzpunkt beim IPS darstellen. Für diese Modulation könnten die nAK α -Syn geeignet sein. Für die genauere Überprüfung ihres anti-inflammatorischen Potenzials sind weitere Studien nötig.

7. Summary

The idiopathic Parkinson's Disease (PD) is a very common neurodegenerative disorder. There is no causal treatment available so far.

Lewy bodies, the characteristic feature in surviving nigral neurons, are one of the pathologic hallmarks in PD. Aggregates of fibrillated α -Synuclein (α -Syn), a 140 amino-acids-long protein that is mainly expressed at presynaptic terminals in the CNS, are the major components of Lewy bodies.

Recently, natural occurring autoantibodies against α -Syn (nAB α -Syn) were detected in the peripheral blood of PD patients and controls (Papachroni et al., 2007). In our group, we affinity-purified nABs α -Syn from intravenous immunoglobulins (IVIG) for further characterization.

Since the physiological function of the nAB α -Syn in the human organism is still poorly known, the aim of this project was to specify the interaction of the nABs α -Syn with α -Syn-fragments for providing better understanding and possible treatment application of the nABs α -Syn.

This was tested with truncated α -Syn-fragments representing the functional regions of the protein: residues 1-60 (N-terminal domain), residues 1-95 (N-terminal domain + NAC-region), residues 61-140 (NAC-region + C-terminal domain), residues 96-140 (C-terminal domain) and NACP112 (alternative splicing-induced deletion variant lacking amino acids 103-130). The fragments were either freshly prepared or aged for 7 days.

First, the epitop(s) on α -Syn for the nAB α -Syn should to be determined. Therefore, binding properties of nAB α -Syn and α -Syn-fragments were analysed in antigen-antibody-binding-assays such as ELISA and Dot Blot. However, neither epitopes for the nAB α -Syn nor clear binding characteristics of the nAB α -Syn to the α -Syn-fragment regions could be identified. The differing binding properties in the assays points to the coexistence of linear and conformational epitopes.

Second, the influence of the α -Syn-fragments on cell integrity and viability was tested on primary murine cortical neurons and primary murine microglia using LDH- and MTT-assays. The fragments 1-95, 61-140 and α -Syn 112 decreased cell viability in the primary neuronal culture as measured by MTT-assay. These cytotoxic α -Syn-fragments were subsequently preincubated with the nAB α -

Syn-fragments and then added to the primary neuronal culture. There was a rescue effect on the α -Syn-fragments 1-95 and α -Syn 112 as shown by increased cell viability. Though, the same rescue effect was attained by preincubation with IVIG.

Third, α -Syn-fragments added extracellularly to a primary murine microglia culture were compared in their ability to induce the release of the proinflammatory cytokines (TNF α and IL-6). Nearly all α -Syn-fragments (except for 1-60 for IL-6) induced the release of these two cytokines. Subsequently, the impact of the nAB α -Syn on the cytokine release was determined. There was a highly significant reduction of the TNF α - and IL-6 release by preincubation with the nAB α -Syn (except for 61-140 for TNF α).

These results underline for the first time the possible anti-inflammatory effect of the nAB α -Syn on α -Syn-induced microglia activation. Furthermore the findings point to a possible neuroprotective potential for the nAB α -Syn and similarly for IVIG. The overactivation of microglia is an important pathomechanism in PD. Modulating the microglia activity, for example by blocking the release of proinflammatory cytokines with the nAB α -Syn, may therefore provide an important therapeutic target. Further research has to be carried out for the exploration of the nAB α -Syn anti-inflammatory potential.

8. Literaturverzeichnis

1. Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25: 239-252, 2000.
2. Aerts MB, Abdo WF, Bloem BR. The "bicycle sign" for atypical parkinsonism. *Lancet* 377: 125-126, 2011.
3. Bennett MC. The role of alpha-synuclein in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther* 105: 311-331, 2005.
4. BesongAgbo D, Seitz F, Binder C, Sturn A, Rabenstein M, Neff F, Andrei-Selmer L, Noelker C, Bacher M, Balzer-Geldsetzer M, Dodel R. Naturally Occurring Autoantibodies Against alpha-Synuclein that Inhibit its Aggregation and Cytotoxicity. Eingereicht.
5. Beyer K. Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta Neuropathol* 112: 237-251, 2006.
6. Beyer K, Lao JI, Carrato C, Mate JL, Lopez D, Ferrer I, Ariza A. Differential expression of alpha-synuclein isoforms in dementia with Lewy bodies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30: 601-607, 2004.
7. Bialecka M, Klodowska-Duda G, Kurzawski M, Slawek J, Gorzkowska A, Opala G, Bialecki P, Sagan L, Drożdżik M. Interleukin-10 (IL10) and tumor necrosis factor alpha (TNF) gene polymorphisms in Parkinson's disease patients. *Parkinsonism Relat Disord* 14: 636-640, 2008.
8. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8: 57-69, 2007.
9. Bodles AM, Guthrie DJ, Greer B, Irvine GB. Identification of the region of non-Abeta component (NAC) of Alzheimer's disease amyloid responsible for its aggregation and toxicity. *J Neurochem* 78: 384-395, 2001.
10. Bodles AM, Guthrie DJ, Harriott P, Campbell P, Irvine GB. Toxicity of non-abeta component of Alzheimer's disease amyloid, and N-terminal fragments thereof, correlates to formation of beta-sheet structure and fibrils. *Eur J Biochem* 267: 2186-2194, 2000.
11. Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y, Hirsch EC. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 172: 151-154, 1994.
12. Bolin LM, Strycharska-Orczyk I, Murray R, Langston JW, Di Monte D. Increased vulnerability of dopaminergic neurons in MPTP-lesioned interleukin-6 deficient mice. *J Neurochem* 83: 167-175, 2002.
13. Braak H, Braak E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol* 247 Suppl 2: II3-10, 2000.

14. Braak H, Del Tredici K. [Pathophysiology of sporadic Parkinson's disease]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 78 Suppl 1: S2-4, 2010.
15. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24: 197-211, 2003.
16. Britschgi M, Olin CE, Johns HT, Takeda-Uchimura Y, LeMieux MC, Rufibach K, Rajadas J, Zhang H, Tomooka B, Robinson WH, Clark CM, Fagan AM, Galasko DR, Holtzman DM, Jutel M, Kaye JA, Lemere CA, Leszek J, Li G, Peskind ER, Quinn JF, Yesavage JA, Ghiso JA, Wyss-Coray T. Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 12145-12150, 2009.
17. Brody DL, Holtzman DM. Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders. *Annu Rev Neurosci* 31: 175-193, 2008.
18. Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 329: 1663-1667, 2010.
19. Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R, Lu B, Nussbaum RL. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci* 22: 8797-8807, 2002.
20. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 3666-3670, 1975.
21. Castaño A, Herrera AJ, Cano J, Machado A. The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF-alpha, IL-1beta and IFN-gamma. *J Neurochem* 81: 150-157, 2002.
22. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destee A. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364: 1167-1169, 2004.
23. Chen Y, Park YB, Patel E, Silverman GJ. IgM antibodies to apoptosis-associated determinants recruit C1q and enhance dendritic cell phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol* 182: 6031-6043, 2009.
24. Chertoff M, Di Paolo N, Schoeneberg A, Depino A, Ferrari C, Wurst W, Pfizenmaier K, Eisel U, Pitossi F. Neuroprotective and neurodegenerative effects of the chronic expression of tumor necrosis factor α in the nigrostriatal dopaminergic circuit of adult mice. *Exp Neurol* 227: 237-251, 2011.

25. Chou MY, Fogelstrand L, Hartvigsen K, Hansen LF, Woelkers D, Shaw PX, Choi J, Perkmann T, Bäckhed F, Miller YI, Hörkö S, Corr M, Witztum JL, Binder CJ. Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. *J Clin Invest* 119: 1335-1349, 2009.
26. Clayton DF, George JM. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci* 21: 249-254, 1998.
27. Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Harper JD, Williamson RE, Lansbury PT, Jr. Accelerated oligomerization by Parkinson's disease linked alpha-synuclein mutants. *Ann N Y Acad Sci* 920: 42-45, 2000.
28. Cookson MR. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem* 74: 29-52, 2005.
29. Croisier E, Moran LB, Dexter DT, Pearce RK, Graeber MB. Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition. *J Neuroinflammation* 2: 14, 2005.
30. Culvenor JG, McLean CA, Cutt S, Campbell BC, Maher F, Jäkälä P, Hartmann T, Beyreuther K, Masters CL, Li QX. Non-Abeta component of Alzheimer's disease amyloid (NAC) revisited. NAC and alpha-synuclein are not associated with Abeta amyloid. *Am J Pathol* 155: 1173-1181, 1999.
31. Danzer KM, Haasen D, Karow AR, Moussaud S, Habeck M, Giese A, Kretschmar H, Hengerer B, Kostka M. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J Neurosci* 27: 9220-9232, 2007.
32. Dauer W, Kholodilov N, Vila M, Trillat AC, Goodchild R, Larsen KE, Staal R, Tieu K, Schmitz Y, Yuan CA, Rocha M, Jackson-Lewis V, Hersch S, Sulzer D, Przedborski S, Burke R, Hen R. Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14524-14529, 2002.
33. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39: 889-909, 2003.
34. Dodel R, Bacher M, Przybylski M, Stefanescu R, Manea M. Diagnosis and Treatment of Alzheimer's and other Neurodementing Diseases: US Patent Application 20090028869, 2009.
35. Dodel R, Balakrishnan K, Keyvani K, Deuster O, Neff F, Andrei-Selmer LC, Röskam S, Stür C, Al-Abed Y, Noelker C, Balzer-Geldsetzer M, Oertel W, Du Y, Bacher M. Naturally occurring autoantibodies against beta-amyloid: investigating their role in transgenic animal and in vitro models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31: 5847-5854, 2011.
36. Dodel R, Neff F, Noelker C, Pul R, Du Y, Bacher M, Oertel W. Intravenous immunoglobulins as a treatment for Alzheimer's disease: rationale and current evidence. *Drugs* 70: 513-528, 2010.

37. Du Y, Dodel R, Hampel H, Buerger K, Lin S, Eastwood B, Bales K, Gao F, Moeller HJ, Oertel W, Farlow M, Paul S. Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology* 57: 801-805, 2001.
38. Du Y, Wei X, Dodel R, Sommer N, Hampel H, Gao F, Ma Z, Zhao L, Oertel WH, Farlow M. Human anti-beta-amyloid antibodies block beta-amyloid fibril formation and prevent beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Brain* 126: 1935-1939, 2003.
39. Durandy A, Kaveri SV, Kuijpers TW, Basta M, Miescher S, Ravetch JV, Rieben R. Intravenous immunoglobulins--understanding properties and mechanisms. *Clin Exp Immunol* 158 Suppl 1: 2-13, 2009.
40. Eggert KM, Oertel, WH. Leitlinie Parkinson-Syndrome Diagnostik und Therapie. In: *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie.*: H.C. Diener und N. Putzki, hrsg. Georg Thieme Verlag., 2008.
41. El-Agnaf OM, Jakes R, Curran MD, Middleton D, Ingenito R, Bianchi E, Pessi A, Neill D, Wallace A. Aggregates from mutant and wild-type alpha-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of beta-sheet and amyloid-like filaments. *FEBS Lett* 440: 71-75, 1998.
42. El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, Curran MD, Court JA, Mann DM, Ikeda S, Cookson MR, Hardy J, Allsop D. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J* 17: 1945-1947, 2003.
43. Emadi S, Barkhordarian H, Wang MS, Schulz P, Sierks MR. Isolation of a human single chain antibody fragment against oligomeric alpha-synuclein that inhibits aggregation and prevents alpha-synuclein-induced toxicity. *J Mol Biol* 368: 1132-1144, 2007.
44. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4: 160-164, 2002.
45. Gao HM, Hong JS. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends Immunol* 29: 357-365, 2008.
46. Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong JS, Liu B. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 81: 1285-1297, 2002.
47. Gao HM, Kotzbauer PT, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM. Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. *J Neurosci* 28: 7687-7698, 2008.
48. Gao X, Chen H, Schwarzschild MA, Ascherio A. Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. *Neurology* 76: 863-869, 2011.

49. Gasser T. Update on the genetics of Parkinson's disease. *Mov Disord* 22 Suppl 17: S343-350, 2007.
50. Gosavi N, Lee HJ, Lee JS, Patel S, Lee SJ. Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar alpha-synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion. *J Biol Chem* 277: 48984-48992, 2002.
51. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40: 140-155, 2002.
52. Harms AS, Barnum CJ, Ruhn KA, Varghese S, Treviño I, Blesch A, Tansey MG. Delayed dominant-negative TNF gene therapy halts progressive loss of nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Mol Ther* 19: 46-52, 2011.
53. Hartung HP. Advances in the understanding of the mechanism of action of IVIg. *J Neurol* 255 Suppl 3: 3-6, 2008.
54. Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 8: 382-397, 2009.
55. Holdorff B. Friedrich Heinrich Lewy (1885-1950) and his work. *J Hist Neurosci* 11: 19-28, 2002.
56. Ibanez P, Bonnet AM, Debarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Durr A, Brice A. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 364: 1169-1171, 2004.
57. Irvine GB, El-Agnaf OM, Shankar GM, Walsh DM. Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol Med* 14: 451-464, 2008.
58. Iwai A, Yoshimoto M, Masliah E, Saitoh T. Non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid (NAC) is amyloidogenic. *Biochemistry* 34: 10139-10145, 1995.
59. Jellinger KA. A critical evaluation of current staging of alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Biochim Biophys Acta* 1792: 730-740, 2009.
60. Jensen PH, Hager H, Nielsen MS, Hojrup P, Gliemann J, Jakes R. alpha-synuclein binds to Tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. *J Biol Chem* 274: 25481-25489, 1999.
61. Kalivendi SV, Yedlapudi D, Hillard CJ, Kalyanaraman B. Oxidants induce alternative splicing of alpha-synuclein: Implications for Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 48: 377-383.
62. Kempster PA, Hurwitz B, Lees AJ. A new look at James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy. *Neurology* 69: 482-485, 2007.
63. Kessler JC, Rochet JC, Lansbury PT, Jr. The N-terminal repeat domain of alpha-synuclein inhibits beta-sheet and amyloid fibril formation.

Biochemistry 42: 672-678, 2003.

64. Kim YS, Joh TH. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Mol Med* 38: 333-347, 2006.

65. Klegeris A, McGeer PL. Complement activation by islet amyloid polypeptide (IAPP) and alpha-synuclein 112. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 1096-1099, 2007.

66. Klegeris A, Pelech S, Giasson BI, Maguire J, Zhang H, McGeer EG, McGeer PL. Alpha-synuclein activates stress signaling protein kinases in THP-1 cells and microglia. *Neurobiol Aging* 29: 739-752, 2008.

67. Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18: 106-108, 1998.

68. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219: 979-980, 1983.

69. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39: 151-170, 1990.

70. Lee HJ, Choi C, Lee SJ. Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *J Biol Chem* 277: 671-678, 2002.

71. Lee HJ, Patel S, Lee SJ. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci* 25: 6016-6024, 2005.

72. Lee MK, Stirling W, Xu Y, Xu X, Qui D, Mandir AS, Dawson TM, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL. Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8968-8973, 2002.

73. Lee SB, Park SM, Ahn KJ, Chung KC, Paik SR, Kim J. Identification of the amino acid sequence motif of alpha-synuclein responsible for macrophage activation. *Biochem Biophys Res Commun* 381: 39-43, 2009.

74. Li W, West N, Colla E, Pletnikova O, Troncoso JC, Marsh L, Dawson TM, Jakala P, Hartmann T, Price DL, Lee MK. Aggregation promoting C-terminal truncation of alpha-synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2162-2167, 2005.

75. Lutz HU, Binder CJ, Kaveri S. Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease. *Trends Immunol* 30: 43-51, 2009.

76. Löffler, Petrides. *Biochemie & Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2003.

77. Magga J, Puli L, Pihlaja R, Kanninen K, Neulamaa S, Malm T, Härtig W, Grosche J, Goldsteins G, Tanila H, Koistinaho J, Koistinaho M. Human intravenous immunoglobulin provides protection against A β toxicity by multiple mechanisms in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 7: 90, 2010.
78. Masliah E, Rockenstein E, Adame A, Alford M, Crews L, Hashimoto M, Seubert P, Lee M, Goldstein J, Chilcote T, Games D, Schenk D. Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron* 46: 857-868, 2005.
79. Masliah E, Rockenstein E, Mante M, Crews L, Spencer B, Adame A, Patrick C, Trejo M, Ubhi K, Rohn TT, Mueller-Steiner S, Seubert P, Barbour R, McConlogue L, Buttini M, Games D, Schenk D. Passive immunization reduces behavioral and neuropathological deficits in an alpha-synuclein transgenic model of Lewy body disease. *PLoS One* 6: e19338, 2011.
80. McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38: 1285-1291, 1988.
81. Mihajlovic M, Lazaridis T. Membrane-bound structure and energetics of alpha-synuclein. *Proteins* 70: 761-778, 2008.
82. Mitchell J. Small molecule immunosensing using surface plasmon resonance. *Sensors (Basel)* 10: 7323-7346, 2010.
83. Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 165: 208-210, 1994.
84. Montgomery SL, Bowers WJ. Tumor Necrosis Factor-alpha and the Roles it Plays in Homeostatic and Degenerative Processes Within the Central Nervous System. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2011.
85. Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 982-985, 2000.
86. Murphy, Travers, Walport. *Janeway Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
87. Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VM. Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci* 20: 3214-3220, 2000.
88. Neff F, Wei X, Nolker C, Bacher M, Du Y, Dodel R. Immunotherapy and naturally occurring autoantibodies in neurodegenerative disorders. *Autoimmun Rev* 7: 501-507, 2008.

89. Nelson, Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*, (3rd Edition ed.), http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/Protein_Properties/protein_purification.htm, Stand 17.05.2012.
90. Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K, Onoa B, Lee MK, Chaudhry FA, Nicoll RA, Edwards RH. Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron* 65: 66-79, 2010.
91. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308: 1314-1318, 2005.
92. Papachroni KK, Ninkina N, Papapanagiotou A, Hadjigeorgiou GM, Xiromerisiou G, Papadimitriou A, Kalofoutis A, Buchman VL. Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease. *J Neurochem* 101: 749-756, 2007.
93. Park KM, Bowers WJ. Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cell Signal* 22: 977-983, 2010.
94. Park SM, Jung HY, Chung KC, Rhim H, Park JH, Kim J. Stress-induced aggregation profiles of GST-alpha-synuclein fusion proteins: role of the C-terminal acidic tail of alpha-synuclein in protein thermosolubility and stability. *Biochemistry* 41: 4137-4146, 2002.
95. Park SM, Jung HY, Kim HO, Rhim H, Paik SR, Chung KC, Park JH, Kim J. Evidence that alpha-synuclein functions as a negative regulator of Ca(++)-dependent alpha-granule release from human platelets. *Blood* 100: 2506-2514, 2002.
96. Park SM, Jung HY, Kim TD, Park JH, Yang CH, Kim J. Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of alpha-synuclein, a molecular chaperone. *J Biol Chem* 277: 28512-28520, 2002.
97. Parker CE, Papac DI, Trojak SK, Tomer KB. Epitope mapping by mass spectrometry: determination of an epitope on HIV-1 IIIB p26 recognized by a monoclonal antibody. *J Immunol* 157: 198-206, 1996.
98. Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14: 223-236; discussion 222, 2002.
99. Parkkinen L, Pirttilä T, Tervahauta M, Alafuzoff I. Widespread and abundant alpha-synuclein pathology in a neurologically unimpaired subject. *Neuropathology* 25: 304-314, 2005.
100. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-2047, 1997.

101. Rojanathammanee L, Murphy EJ, Combs CK. Expression of mutant alpha-synuclein modulates microglial phenotype in vitro. *J Neuroinflammation* 8: 44, 2011.
102. Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet* 363: 1783-1793, 2004.
103. Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, Kawaguchi T, Tsunoda T, Watanabe M, Takeda A, Tomiyama H, Nakashima K, Hasegawa K, Obata F, Yoshikawa T, Kawakami H, Sakoda S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Nakamura Y, Toda T. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 41: 1303-1307, 2009.
104. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandever C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400: 173-177, 1999.
105. Schulz-Schaeffer WJ. The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathol* 120: 131-143, 2010.
106. Schütt, Bröcker. *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2011.
107. Serpell LC, Berriman J, Jakes R, Goedert M, Crowther RA. Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4897-4902, 2000.
108. Sewell WA, North ME, Cambronero R, Webster AD, Farrant J. In vivo modulation of cytokine synthesis by intravenous immunoglobulin. *Clin Exp Immunol* 116: 509-515, 1999.
109. Shoenfeld Y, Isenberg D. *The mosaic of autoimmunity*: Elsevier, 1989.
110. Shulman JM, De Jager PL, Feany MB. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 6: 193-222, 2011.
111. Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, Paisan-Ruiz C, Lichtner P, Scholz SW, Hernandez DG, Krüger R, Federoff M, Klein C, Goate A, Perlmutter J, Bonin M, Nalls MA, Illig T, Gieger C, Houlden H, Steffens M, Okun MS, Racette BA, Cookson MR, Foote KD, Fernandez HH, Traynor BJ, Schreiber S, Arepalli S, Zonozi R, Gwinn K, van der Brug M, Lopez G, Chanock SJ, Schatzkin A, Park Y, Hollenbeck A, Gao J, Huang X, Wood NW, Lorenz D, Deuschl G, Chen H, Riess O, Hardy JA, Singleton AB, Gasser T. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet* 41: 1308-1312, 2009.
112. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A,

Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302: 841, 2003.

113. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett* 251: 205-208, 1998.

114. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839-840, 1997.

115. Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP. Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *FASEB J* 16: 1474-1476, 2002.

116. Stangel M, Pul R. Basic principles of intravenous immunoglobulin (IVIg) treatment. *J Neurol* 253 Suppl 5: V18-24, 2006.

117. Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57: 563-581, 1999.

118. Su X, Federoff HJ, Maguire-Zeiss KA. Mutant alpha-synuclein overexpression mediates early proinflammatory activity. *Neurotox Res* 16: 238-254, 2009.

119. Su X, Maguire-Zeiss KA, Giuliano R, Prifti L, Venkatesh K, Federoff HJ. Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 29: 1690-1701, 2008.

120. Sulzer D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 30: 244-250, 2007.

121. Tofaris GK, Spillantini MG. Physiological and pathological properties of alpha-synuclein. *Cell Mol Life Sci* 64: 2194-2201, 2007.

122. Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11282-11286, 1993.

123. Uversky VN. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem* 103: 17-37, 2007.

124. Uversky VN, Li J, Fink AL. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J Biol Chem* 276: 44284-44296, 2001.

125. Uversky VN, Yamin G, Munishkina LA, Karymov MA, Millett IS, Doniach S, Lyubchenko YL, Fink AL. Effects of nitration on the structure and aggregation of alpha-synuclein. *Brain Res Mol Brain Res* 134: 84-102, 2005.

126. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 8: 253-278, 1990.
127. Venda LL, Cragg SJ, Buchman VL, Wade-Martins R. α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 33: 559-568, 2010.
128. Volles MJ, Lansbury PT, Jr. Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry* 42: 7871-7878, 2003.
129. Wahner AD, Sinsheimer JS, Bronstein JM, Ritz B. Inflammatory cytokine gene polymorphisms and increased risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 64: 836-840, 2007.
130. Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology* 27: 494-506, 2007.
131. Waxman EA, Giasson BI. Molecular mechanisms of alpha-synuclein neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1792: 616-624, 2009.
132. Winter Y, Balzer-Geldsetzer M, Spottke A, Reese JP, Baum E, Klotsche J, Rieke J, Simonow A, Eggert K, Oertel WH, Dodel R. Longitudinal study of the socioeconomic burden of Parkinson's disease in Germany. *Eur J Neurol* 17: 1156-1163, 2010.
133. Wolters, Van Laar, Berendse (eds.). *Parkinsonism and Related Disorders*. Amsterdam: VU University Press, 2010.
134. Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci* 22: 1763-1771, 2002.
135. Xu J, Kao SY, Lee FJ, Song W, Jin LW, Yankner BA. Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat Med* 8: 600-606, 2002.
136. Yanamandra K, Gruden MA, Casaite V, Meskys R, Forsgren L, Morozova-Roche LA. α -synuclein reactive antibodies as diagnostic biomarkers in blood sera of Parkinson's disease patients. *PLoS One* 6: e18513, 2011.
137. Zarranz JJ et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55: 164-173, 2004.
138. Zhang W et al.. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J* 19: 533-542, 2005.

9. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| A β | Amyloid β |
| AD | Alzheimer'sche Erkrankung |
| AK | Antikörper |
| AS | Aminosäure |
| α -Syn | α -Synuclein |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CD | Circular dichroismus |
| COMT | Catechol-O-Methyltransferase |
| COX-2 | Cyclooxygenase-2 |
| DLB | Demenz mit Lewy-Körpern |
| DMEM | Dulbecco/Vogt Modified Eagle's Minimal Essential Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbant Assay |
| et al. | et alii/et aliae |
| Fab | Fragment of antigen binding |
| Fc | Constant Fragment |
| FT | FlowThrough |
| GWAS | Genome-wide association studies |
| HRP | Horseradish-Peroxidase |
| HSA | Humanes Serumalbumin |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| iNOS | induzierbare NO-Synthase |
| IPS | Idiopathisches Parkinson-Syndrom, Morbus Parkinson |
| IVIG | Intravenöse Immunglobuline |
| kDa | Kilodalton |
| LDH | Lactatdehydrogenase |
| L-DOPA | L-3,4-Dihydroxyphenylalanin |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| mAK α -Syn | monoklonaler Antikörper gegen α -Synuclein |
| MALDI-ToF | Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization kombiniert mit Time of Flight |

| | |
|-------------------|--|
| MAO-A/B | Monoaminoxidase A/B |
| MIF | Macrophage Migration Inhibitory Factor |
| MPP ⁺ | 1-Methyl-4-phenylpyridinium |
| MPTP | 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin |
| mRNA | Messenger Ribonucleic Acid |
| MSA | Multisystematrophie |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| NAC | Non-Amyloid β Component |
| NACP | Non-Amyloid β Component Precursor |
| NACP 112 | α -Synuclein 112 |
| NADPH | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| nAK | natürlich vorkommende Autoantikörper |
| nAK A β | natürlich vorkommende Autoantikörper gegen Amyloid β |
| nAK α -Syn | natürlich vorkommende Autoantikörper gegen α -Synuclein |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PD | Parkinson's disease |
| PM | Primäre murine mesencephale Mikroglia |
| PN | Primäre kortikale Neurone |
| PS | Parkinsonismus |
| REM-Schlaf | Rapid Eye Movement - Schlaf |
| ROS | Reaktive Sauerstoffverbindungen, |
| rpm | Rotationen pro Minute |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes |
| SDS-PAGE | Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis |
| SHSY | humane Neuroblastomzelllinie |
| SN | Substantia nigra |
| SNpc | Substantia nigra pars compacta |
| SNARE | Soluble NSF Attachment Protein Receptor |
| SNCA | für α -Synuclein codierendes Gen |
| STN | Nucleus subthalamicus |
| TNF α | Tumornekrosefaktor α |
| ZNS | Zentralnervensystem |

10. Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----|
| Abb. 1.1 | Immunhistochemische Darstellung von α -Syn in Lewy-Körpern | 10 |
| Abb. 1.2 | Veränderungen der motorischen Basalganglienschleife..... | 11 |
| Abb. 1.3 | Ausbreitung der Lewy-Pathologie im ZNS nach Braak..... | 13 |
| Abb. 1.4 | Aminosäuresequenz von α -Syn | 16 |
| Abb. 1.5 | SNCA Gen und α -Syn..... | 17 |
| Abb. 1.6 | Regulierung der präsynaptischen Vesikel..... | 21 |
| Abb. 1.7 | Aggregation von α -Syn | 23 |
| Abb. 1.8 | Aufbau von IgG (schematische Darstellung) | 26 |
| Abb. 1.9 | Reaktive Mikroglie | 33 |
| Abb. 4.1 | IgG-Gehalt in den Elutionsfraktionen der α -Syn-Affinitätssäule..... | 61 |
| Abb. 4.2 | Schematische Darstellung der Affinitätsaufreinigungssäule | 62 |
| Abb. 4.3 | Vergleich Bindungsverhalten von nAK α -Syn und mAK α -Syn im ELISA | 63 |
| Abb. 4.4 | Immunpräzipitation zum Nachweis der Bindung der nAK α -Syn an α -Syn | 65 |
| Abb. 4.5 | CarboLink™-Säule mit mAK α -Syn | 68 |
| Abb. 4.6 | CarboLink™-Säule mit nAK α -Syn | 69 |
| Abb. 4.7 | Sepharose-Säule mit nAK α -Syn | 71 |
| Abb. 4.8 | α -Syn-Fragmente von r-Peptide (schematische Darstellung)..... | 72 |
| Abb. 4.9 | Darstellung der α -Syn-Fragmente auf 12% nativer SDS-PAGE..... | 74 |
| Abb. 4.10 | Bindungsverhalten nAK α -Syn an frische α -Syn-Fragmente | 76 |
| Abb. 4.11 | Bindungsverhalten nAK α -Syn an gealterte α -Syn-Fragmente..... | 77 |
| Abb. 4.12 | Bindungsverhalten FT an α -Syn-Fragmente..... | 79 |
| Abb. 4.13 | Bindungsverhalten mAK α -Syn an α -Syn-Fragmente..... | 82 |
| Abb. 4.14 | Bindungsverhalten nAK α -Syn an α -Syn-Fragmente..... | 84 |
| Abb. 4.15 | Bindungsverhalten mAK α -Syn an α -Syn-Fragmente..... | 85 |
| Abb. 4.16 | Bindungsverhalten Zweitantikörper an α -Syn-Fragmente | 86 |
| Abb. 4.17 | Bindungsverhalten nAK α -Syn/ FT an α -Syn-Fragmente..... | 87 |
| Abb. 4.18 | Bindungsverhalten der Antikörper an HSA und Casein | 89 |
| Abb. 4.19 | CD-Spektrometrische Darstellung der α -Syn-Fragmente | 92 |
| Abb. 4.20 | Fragment-induzierte LDH-Ausschüttung primärer Neurone..... | 94 |
| Abb. 4.21 | Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion primärer Neurone | 96 |
| Abb. 4.22 | Einfluss von nAK α -Syn und FT auf die Zellvitalität primärer Neurone | 97 |
| Abb. 4.23 | Einfluss der nAK α -Syn auf die Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion | 99 |
| Abb. 4.24A | Einfluss der nAK α -Syn auf die Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion..... | 100 |
| Abb. 4.24B | Einfluss der nAK α -Syn auf die Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion..... | 101 |
| Abb. 4.25 | Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion primärer Mikroglia | 103 |
| Abb. 4.26 | Einfluss der nAK α -Syn auf die Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion | 105 |
| Abb. 4.27 | Fragment-induzierte TNF α -Ausschüttung..... | 107 |
| Abb. 4.28 | Fragment-induzierte IL-6-Ausschüttung..... | 108 |

Abb. 4.27 Einfluss der nAK α -Syn auf die Fragment-induzierte Zytokin-Ausschüttung110

11. Tabellenverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----|
| Tab. 1.1 | Klassifikation der Parkinson-Syndrome | 5 |
| Tab. 1.2 | Für familiäre Parkinson-Syndrome identifizierte Genloci | 8 |
| Tab. 4.1 | Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion primärer Neurone | 95 |
| Tab. 4.2 | Einfluss der nAK α -Syn auf die Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion PN | 98 |
| Tab. 4.3 | Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion PM | 102 |
| Tab. 4.4 | Einfluss der nAK α -Syn auf Fragment-induzierte Vitalitätsreduktion PM | 104 |
| Tab. 4.5 | Eigenschaften der α -Synuclein-Fragmente von r-Peptide | 111 |

12. Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

in Marburg: Aumüller, Bals, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, S. Becker, Cetin, Czubayko, Daut, Dodel, Donner-Banzhoff, Eilers, Elsaesser, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Garten, Geks, Gerdes, Glorius, Gress, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Hasilik, Hassan, Hertl, Hofmann, Hoyer, Jaques, Kann, Klose, König, Koolman, Kuhlmann, Lill, Löffler, Lohoff, Maisch, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Plant, Renz, Richter, Röper, Schade, H. Schäfer, J. Schäfer, Schmidt, Schofer, Schoppet, Schrader, Schütz, Seitz, Steiniger, Vogelmeier, Weihe, Westermann, Wulf.

in Gießen: Riße, Schneider.

in Poitiers/Frankreich: Dufour, Dighiero, Gil, Hankard, Lapierre, Magnin, Marcelli, Neau, Paccalin, Pierre, Senon.

13. Danksagung

Mein Dank gilt...

Prof. Dr. Richard Dodel für das Ermöglichen dieser Arbeit.

Dr. Carmen Nölker für die engagierte Betreuung, Motivation und Inspiration.

Dr. Sascha Hagemann und Dr. Daniela Besong-Agbo für das Erlernen der Methoden und konstruktives Arbeiten.

Dr. Carmen Nölker und cand. med. Roman Sankowski für die Präparation der primären Zellkulturen.

Christine Forbach und Andres Kautz für die freundliche Unterstützung im Labor und insbesondere beim Basteln und Betreiben der Affinitätssäulen.

Dipl. math. Judith Dams für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Andreas Röder für die Zusammenarbeit.

Der gesamten Arbeitsgruppe für die gute Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern für die stetige Unterstützung.